

**Die Rolle von Neutrophil Extracellular Traps
(NETs) in der Thrombusstabilisierung -
Vergleich der arteriellen Thrombose bei der
Maus und beim Menschen**

von Vanessa Philippi

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Die Rolle von Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in der
Thrombusstabilisierung - Vergleich der arteriellen Thrombose bei der Maus
und beim Menschen

von Vanessa Philippi

aus Bottrop

München 2016

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Anatomie, Histologie und Embryologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Priv.-Doz. Dr. Sven Reese

Angefertigt am Deutschen Herzzentrum München und am Klinikum der
Universität München in Großhadern

Mentor: Prof. Dr. med. Steffen Massberg

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Sven Reese

Korreferent/ en: Priv.-Doz. Dr. Gerhard Wess

Tag der Promotion: 06. Februar 2016

Meinem Großvater Friedel gewidmet, der mir die Inspiration für diese
Thematik gegeben hat und immer in meinem Herzen bleiben wird.

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	2
1.	Arterien	2
1.1.	Aufbau und Funktion	2
1.2.	Pathologische Veränderungen der arteriellen Gefäßwand	3
2.	Die koronare Herzerkrankung	3
2.1.	Definition und Epidemiologie	3
2.2.	Ätiologie und Pathogenese - Atherosklerose	4
2.3.	Duale antithrombozytäre Therapie	8
3.	Arterielle Thrombose	10
3.1.	Definition	10
3.2.	Bisherige Erkenntnisse zur Entstehung arterieller Thrombose	10
3.2.1.	Bedeutung des Endothels	10
3.2.2.	Beteiligung der Thrombozyten	11
3.2.3.	Gerinnungskaskade	13
3.2.4.	Beitrag von Leukozyten zur arteriellen Thrombose	14
4.	Neutrophil Extracellular Traps (NETs)	15
4.1.	Definition	15
4.2.	Entstehung und Struktur	15
4.3.	Funktion von NETs	17
5.	Zielsetzung	18
III.	MATERIAL UND METHODEN	19
1.	Rekrutierung von Patienten und Gewinnung humaner Thromben	19
1.1.	Definition des Thrombusalters	19
2.	Gewinnung muriner Thromben	19
2.1.	Verwendete Versuchstiere	19
2.2.	Haltungsbedingungen der Tiere vor dem Versuch	20
2.3.	Narkose und weitere OP-Vorbereitungen	20
2.4.	<i>In vivo</i> -Maus-Modelle der arteriellen Thrombose	22
2.4.1.	Drahtdenudations-Modell	22

2.4.2.	Eisen-III-Chlorid-Modell	23
2.4.3.	Schwanzveneninjektion.....	25
2.5.	Thrombusentnahme	25
3.	Intravitalmikroskopie	26
3.1.	Prinzip der IVM	26
3.2.	Verwendete Enzyme und Fluorochrome.....	27
3.2.1.	Cl-amidine.....	27
3.2.2.	Dihydrodichlorofluoreszein	27
3.3.	Isolierung und Applizierung von Thrombozyten	28
4.	Histologie.....	29
4.1.	Anfertigung von histologischen Schnitten	29
4.2.	Immunfluoreszenzfärbung	29
1.1.1.	Präparatvorbereitungen	30
1.1.2.	Verwendete Antikörper	32
1.1.3.	Präparatnachbereitungen	32
1.1.4.	Färbekontrollen	33
1.2.	Auswertung	34
1.2.1.	Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen	34
1.2.2.	Statistische Auswertung	34
IV.	ERGEBNISSE	36
1.	Thrombozyten und Leukozyten spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung der arteriellen Thrombose in der Maus	36
2.	Vergleichbare Mechanismen der arteriellen Thrombose bei Maus und Mensch	39
3.	NETs spielen eine entscheidende Rolle in der Entstehung und Stabilisierung arterieller Thromben in der Maus.....	47
4.	Nachweis von NETs in humanen arteriellen Thromben	49
V.	DISKUSSION	53
1.	Zentrale Erkenntnisse dieser Arbeit	53
2.	Diskussion der Methoden	54
2.1.	Wahl der Maus als Versuchstier.....	54
2.2.	Wahl der murinen arteriellen Thrombose-Modelle.....	54

2.2.1.	Grenzen des Modells.....	55
2.3.	Die Verwendung von Cl-amidine im murinen Modell zur Ermittlung des Einflusses von NETs auf die Thrombusstabilität.....	56
3.	Diskussion der Ergebnisse	57
3.1.	Die arterielle Thrombose entsteht aus der Interaktion zwischen Thrombozyten, Leukozyten und Faktoren des Gerinnungssystems	57
3.2.	Die Bedeutung von NETs für die arterielle Thrombusstabilisierung.....	58
3.3.	Einflussfaktoren auf die Versuchsergebnisse dieser Arbeit.....	60
4.	Ausblick.....	61
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	62
VII.	SUMMARY	63
VIII.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	64
IX.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	65
X.	TABELLENVERZEICHNIS	67
XI.	LITERATURVERZEICHNIS	68
XII.	DANKSAGUNG	79

I. EINLEITUNG

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind weltweit eine der häufigsten Todesursachen. Laut der aktuellen Erhebung des Bundesamtes für Statistik aus dem Jahr 2013 gehören ischämische Herzerkrankungen und der akute Myokardinfarkt zu den beiden häufigsten Todesursachen in Deutschland¹. Global betrachtet starben laut der Weltgesundheitsorganisation geschätzte 17,3 Millionen Menschen im Jahr 2008 an einer kardiovaskulären Erkrankung. Davon sind 7,3 Millionen Menschen aufgrund einer Koronaren Herzerkrankung gestorben. Die WHO schätzt, dass die Zahl der Todesfälle bis 2030 von 17,3 auf 23,3 Millionen steigen wird². Daher besteht ein dringender Bedarf diesem Anstieg therapeutisch entgegen wirken zu können. Dafür ist es notwendig die kardiovaskulären Risikofaktoren zu minimieren und ein erweitertes Verständnis der pathophysiologischen Mechanismen zu erlangen.

Zu den häufigsten Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen zählen Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie, arterieller Hypertonus, familiäre Disposition und Nikotinabusus. Diese Risikofaktoren können die Ausbildung von arteriosklerotischen Plaques in den Koronararterien begünstigen. Die Ruptur einer arteriosklerotischen Plaque ist eine der Hauptursachen für die Entstehung von arterieller Thrombose bei Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt.

Die molekularen Mechanismen des Myokardinfarktes sind in verschiedenen *in vivo*-Mausmodellen untersucht worden³⁻⁵. Dennoch fehlten bis jetzt noch vergleichbare Studien zwischen Maus und Mensch, um gemeinsame Charakteristika aufzeigen zu können, und um ebenfalls Unterschiede zwischen beiden Spezies zu zeigen. Im Zuge dieser Studie, sind daher Thromben der beiden am besten etablierten *in vivo*-Mausmodelle der arteriellen Thrombose mit humanen arteriellen Thromben verglichen worden. Dabei lag der Fokus dieser Untersuchung auf den zellulären Komponenten von arteriellen Thromben, *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs) und Faktoren des Gerinnungssystems, und deren Vergleichbarkeit zwischen Maus und Mensch. Durch die Erforschung der zellulären Entstehungsmechanismen der arteriellen Thrombose im Detail können eventuell neue therapeutische Ansätze gefunden werden, abgesehen von der schon im klinischen Alltag lange angewandten antithrombozytären Therapie.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Arterien

1.1. Aufbau und Funktion

Arterien sind die Gefäße des Körpers, die das Blut vom Herzen wegführen. Der kleine Kreislauf führt das Blut über die pulmonalen Arterien in die Lunge und der große Kreislauf führt das Blut über die Aorta in die Peripherie des Körpers. Die Gefäßwand des arteriellen Systems ist im Gegensatz zu der, des venösen Systems deutlich dicker. Dies ist für den Bluttransport unter hohem Druck in die Körperperipherie notwendig. Vereinfacht dargestellt besteht die Gefäßwand aus drei Schichten, der Tunica intima, media und externa. Die Tunica intima besteht von intravasal nach extravasal gehend aus dem Endothel, einer kollagenen Bindegewebsschicht und einer elastischen Membran⁶. Die Endothelschicht fungiert dabei als Barriere zwischen Intravasalraum und interstitiellem Raum⁷. Sie ist besonders gut an den hohen intravasalen Druck und die Pulswellen angepasst⁸. Die Tunica media besteht aus elastischen Fasern, glatten Muskelzellen und Kollagenfasern. Diese Arterien-schicht kann man in 2 Typen unterteilen, den elastischen und den muskulären Typ. Herznahe Arterien gehören zum elastischen Typ und gehen im Verlauf in der Peripherie in den muskulären Typ über⁶.

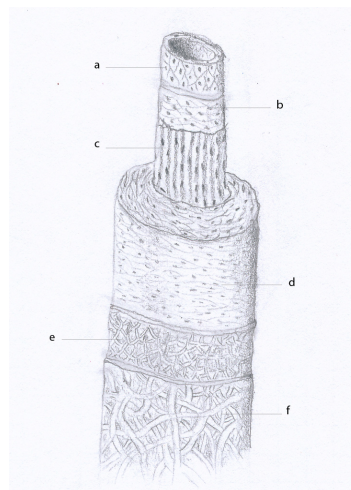


Abbildung 1: Aufbau der Arterienwand modifiziert nach Waibl et al.⁶

a: Lamina endotheliales, b: Stratum subendotheliale, c: Membrana elastica interna, (a-c: Tunica intima), d: Tunica media, e: Lamina elastica externa; e, f: Tunica externa

1.2. Pathologische Veränderungen der arteriellen Gefäßwand

Die arterielle Gefäßwand wird im Laufe eines Lebens durch verschiedenste physiologische und pathologische Prozesse beansprucht. Hinzu kommt die Physiologie des Alterns, die Einfluss auf die Struktur und Anpassungsfähigkeit der Arterienwand nimmt.

Die Kalzifizierung der Arterienwand (Arteriosklerose) kann sich in verschiedenen Formen klinisch manifestieren. Zu unterscheiden ist dabei, die Kalzifizierung der Intima von der, die die Media betrifft. Mediale Kalzifizierung, auch Mönckeberg Sklerose⁹ genannt, tritt meist bei Patienten mit Nierenversagen und Diabetes mellitus auf. Es wird vermutet, dass dies bedingt ist durch Störungen im Stoffwechsel, Elektrolythaushalt und pH-Wert¹⁰. Diese Form der Arterienverkalkung tritt nicht in den Koronararterien auf.

Die Kalzifizierung der Koronararterienwand betrifft stets die Tunica intima. Die sogenannte Atherosklerose kann mit weiterem Fortschreiten der Erkrankung zu einer massiven Einengung des Gefäßlumens führen und somit in einer Stenose resultieren. Weitere Erläuterungen zur Atherosklerose finden sich im Kapitel 2.2 „Ätiologie und Pathogenese – Atherosklerose“.

2. Die koronare Herzerkrankung

2.1. Definition und Epidemiologie

Die koronare Herzerkrankung gehört zum Formenkreis der kardiovaskulären Erkrankungen. Sie ist definiert als Manifestation von Atherosklerose in den Herzkranzarterien. Nach dem neuesten Bericht des Statistischen Bundesamtes aus dem Jahr 2013 ist in Deutschland die häufigste Todesursache die Herz-Kreislauf-Erkrankung, genauer die chronische ischämische Herzerkrankung und der akute Myokardinfarkt¹. Nach der aktuellen Studie der WHO aus dem Jahr 2008 starben geschätzt 17,3 Millionen Menschen an einer kardiovaskulären Erkrankung. Von diesen verstarben 7,3 Millionen Menschen an den Folgen einer koronaren Herzerkrankung². Bis zum Jahr 2030 wird laut der WHO die Sterberate für die kardiovaskulären Erkrankungen auf bis zu 23,3 Millionen steigen².

In den vergangenen Jahren ist die Mortalität der koronaren Herzerkrankung zurückgegangen. Diese Entwicklung ist vor allem begründet durch die verbesserte medizinische Versorgung, nicht durch den Rückgang der Erkrankung selbst.

Deswegen sind effektive Präventivmaßnahmen und neue therapeutische Ansätze von immenser gesellschaftlicher Bedeutung.

2.2. Ätiologie und Pathogenese - Atherosklerose

Laut der WHO ist die Entwicklung einer koronaren Herzerkrankung auf folgende Risikofaktoren zurückzuführen: Nikotinkonsum, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus und Hypercholesterinämie².

Verschiedene Studien zeigen, dass ein deutlicher Zusammenhang zwischen dem Ausmaß an Nikotinkonsum und der Ausprägung von Atherosklerose besteht. So zeigten Witteman et al., dass mit steigendem Nikotinkonsum das Risiko Atherosklerose zu entwickeln im Vergleich zu Nichtrauchern um das 2,3 fache erhöht war¹¹.

Tabakrauch enthält verschiedenste Substanzen, die die Funktion und Integrität des Gefäßendothels schädigen können. Sumido et al. zeigten, dass Tabakrauch zu einer Vasokonstriktion der Gefäße führt und die Acetylcholin-abhängige Vasodilatation der Koronargefäße damit unterbindet¹².

Ein weiterer Risikofaktor ist die arterielle Hypertonie. Diese wird in verschiedene Schweregrade eingeteilt. Ab Blutdruckwerten von $\geq 140/90$ mmHg spricht man von einer arteriellen Hypertonie Grad I¹³. Begünstigende Faktoren für die Ausbildung einer arteriellen Hypertonie stellen unter anderem nicht beeinflussbare Faktoren wie Genetik, Alter und Geschlecht dar, aber auch beeinflussbare Faktoren wie Übergewicht und Bewegungsmangel können einen negativen Einfluss auf den Blutdruck haben.

Ein weiterer Risikofaktor für die Ausbildung einer koronaren Herzerkrankung ist die Manifestation eines Diabetes mellitus. Dieser hat Einfluss auf die Funktion des Endothels und der Thrombozyten, sowie auf den Fettstoffwechsel. Hyperglykämie führt zu einer Erhöhung der COX-2-Produktion und damit zu einer Reduzierung des vasodilatativ wirkenden Nitritoxids^{14, 15}. In Folge der zellulären Insulinresistenz kommt es zu einer vermehrten Ausschüttung von freien Fettsäuren aus den Adipozyten. Diese werden in der Leber zu *very low density*-Lipoprotein (VLDL) und Triglyceriden verstoffwechselt. Niedrige *high-density*-Lipoprotein- (HDL) und erhöhte *low-density*-Lipoprotein- (LDL) und Triglycerid-Werte begünstigen den Aufbau eines Atheroms und folglich das Risiko eine

koronare Herzerkrankung auszubilden¹⁶. Durch LDL kommt es am Endothel zu einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen, wie MCP-1, Interleukin-8 und dem *Macrophage colony stimulating factor*, die die Zellinteraktion zwischen Monozyten und Endothelzellen im Zuge der Ausbildung der Arteriosklerose vermitteln. Im Gegensatz dazu wirkt HDL antiatherosklerotisch. Es transportiert LDL zur Leber und unterbindet dessen Oxidierung, sowie die Expression von ICAM-1 und VCAM-1. Damit führt der Diabetes unabhängig von anderen Risikofaktoren zu einer Zunahme der Wanddicke der Tunica intima. Ursächlich für die Zunahme der Wanddicke ist somit die Ausbildung von Fetteinlagerungen, den sogenannten *fatty streaks*, und einhergehend damit einer Infiltration von Makrophagen in diesen Bereichen¹⁷. Zudem zeigte sich, dass Thrombozyten bei Diabetes mellitus Patienten größer sind, vermehrt P-Selektin ausschütten und der GPIIb-Rezeptor in geringem Maße aktiviert wird¹⁸. Eine Reduzierung des Blutglukosespiegels führte zu einer Reduzierung der proatherosklerotischen Thromboxanbildung¹⁹ und folglich zu einer verbesserten Endothelprotektion.

Zudem zeigte sich, dass genetische Faktoren, wie Alter und Geschlecht und Herzinfarkte bei erstgradigen Familienangehörigen vor dem 55. Lebensjahr bei Männern und vor dem 65. Lebensjahr bei Frauen²⁰, eine entscheidende Rolle spielen. Hier liegt eine Androtopie vor, da das Risiko für Männer unter 60 Jahren doppelt so hoch ist eine koronare Herzerkrankung zu entwickeln als für Frauen²¹. Die Gesamtheit verschiedener genetischer und beeinflussbarer Risikofaktoren kann somit über einen längeren Zeitraum zur Entstehung einer chronischen Veränderung der Arterienwand, der Atherosklerose führen.

Im Laufe des Lebens setzt der physiologische Alterungsprozess die Dehnbarkeit der Arterienwand durch die Kalzifizierung herab und führt so zu einer Einschränkung der Windkesselfunktion. Diese reguliert die Blutauswurfsvolumina des Herzens zu einem kontinuierlichen Blutstrom. Durch die zuvor genannten Risikofaktoren kann der chronische Prozess der Atheromabildung zusätzlich begünstigt werden, sich in ausgeprägterer Form in früheren Phasen des Lebens manifestieren und klinisch zu Problemen führen. Atheroma manifestieren sich hauptsächlich an Verzweigungen von arteriellen, elastischen Gefäßen. Im Bereich dieser Prädispositionsstellen besteht ein erhöhter intravasaler Druck und lokal niedrige Schubspannungsverhältnisse. Verminderte Schubspannung führt intravasal zu einer Unterbrechung des laminaren Blutflusses

und lässt Turbulenzen entstehen, die bei chronischen Verläufen eine Endotheldenudation begünstigen können. Giddens et al. zeigten, dass es eine positive Korrelation zwischen niedrigen Schubspannungsverhältnissen und der Wanddicke der Tunica intima in verschiedenen Lokalisationen im arteriellen Gefäßsystem gibt²². Laminare Blutstromverhältnisse besitzen somit eine vorbeugende Funktion für die Entstehung von Atheromen und wirken damit schützend auf die Integrität des Gefäßendothels.

Die exakten molekularen Auslöser, die nun zur Bildung von arteriosklerotischen Plaques führten, sind noch nicht ausreichend belegt. Dennoch gab es im Laufe des letzten Jahrhunderts viele Theorien zur Pathogenese, die letztendlich durch Russel Rosses „Response-to-injury-Theorie“ einen Erklärungsansatz fanden²³.

Auf diese Grundlage baut der aktuelle Stand der Pathogenese auf, der davon ausgeht, dass es sich bei Atherosklerose primär um ein Entzündungsgeschehen handelt. Initial kommt es durch den Einfluss von arterieller Hypertonie, Nikotinkonsum und Diabetes mellitus zu einem Endothelschaden. Die daraus resultierende endotheliale Dysfunktion schafft einhergehend mit einer bestehenden Hyperlipidämie die Grundlage für die Entstehung eines Atheroms. Endotheliale Dysfunktion wird durch einen Mangel an Nitritoxid (NO) bedingt und zeichnet sich durch eine gesteigerte Permeabilität und eine Reduzierung der Regenerationsfähigkeit des Endothels, sowie eine Beeinflussung der Ausprägung von Adhäsionsmolekülen am Endothel aus. In NO-Knock-out-Mäusen konnte gezeigt werden, dass diese vermehrt Arteriosklerose ausbilden und einen erhöhten Blutdruck entwickeln²⁴. Ein weiterer Faktor, der die Funktion von NO beeinflusst, ist oxidativer Stress. Dieser führt zur Bildung von *reactive oxygen species* (ROS), die NO zu dem zytotoxischen Peroxynitrit oxidieren²⁵ und somit dessen vasoprotektive Funktion unterbinden.

In arteriosklerotischen Kaninchenmodellen zeigte sich, dass sich *low-density-Lipoproteine* (LDL) in der frühen Entstehungsphase von arterieller Plaque-Bildung in die subendotheliale Matrix einlagern²⁶. Das Einwandern der LDLs in die Tunica intima wird durch die erhöhte Permeabilität des Endothels und die meist zusätzlich bestehende Hyperlipidämie begünstigt^{27,28}. Dadurch werden die lokalen Endothelzellen aktiviert und exprimieren Adhäsionsmoleküle zur Rekrutierung von Monozyten aus dem Blut. Angelockt durch Chemokine setzen sich Monozyten aus dem Blutstrom an das Endothel fest. Eingewandert in die

Tunica intima, nehmen sie dort als Makrophagen oxidiertes LDL über exprimierte Scavenger Rezeptoren auf²⁹. Die Oxidation des LDLs erfolgt durch die Enzyme Lipoxygenase und Myeloperoxidase. Der Prozess der Schaumzellbildung führt in den Endothelzellen zur Ausschüttung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, die weitere Monozyten und Lymphozyten rekrutieren³⁰. Der erste Schritt der Leukozytenrekrutierung wird durch die Freisetzung von P- und E-Selektin und ICAM-1 auf aktivierten Thrombozyten und Endothelzellen ausgelöst^{31,32}. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation von oxLDL *in vitro* und *in vivo*-Versuchen zu einer Aggregation von Thrombozyten und Monozyten führte³³. Dies leitet die Adhäsionskaskade der Leukozyten ein, indem diese durch einen mehrstufigen Prozess ins extrazelluläre Gewebe einwandern³⁴. Der Entstehungsprozess von Atheromen wird bestimmt durch Zell-Zell-Interaktionen zwischen Endothelzellen und Vertretern der Blutzellen, vorrangig Monozyten und Thrombozyten, sowie T-Lymphozyten. Diese interagieren durch gegenseitige Ausschüttung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren. Die vollständige Aufklärung dieses Prozesses ist Gegenstand der aktuellen Atheroskleroseforschung.

Die durch oxLDL-Aufnahme entstandenen Schaumzellen sterben nach einigen Tagen bis Wochen ab und geben dabei, aufgrund von unvollständiger Efferozytose das aufgenommene Lipoprotein wieder frei. Efferozytose beschreibt den Prozess der Phagozytose toter Zellen. Die Ausbildung eines Atheroms führt neben der Bildung des fetthaltigen Debriskerns zu einer Einwanderung von *smooth muscle cells* (SMCs) aus der Tunica media in die Tunica intima. Im Gegensatz zum Tierreich kommen beim Menschen auch neben der Tunica media, SMCs in der Tunica intima vor³⁵. Über einen längeren Zeitraum kann dieser chronische Entzündungsprozess, der Arterienwand, zur Bildung eines, das Gefäßlumen verengenden Plaques führen. Es besteht ein 10fach erhöhtes Risiko einer Plaqueruptur, wenn diese besonders groß ist, eine dünne fibröse, kollagen-arme Kapsel besitzt, wenige SMCs und zahlreiche Makrophagen aufweist und zudem das Gefäßlumen stark eingeengt ist³⁶⁻³⁸.

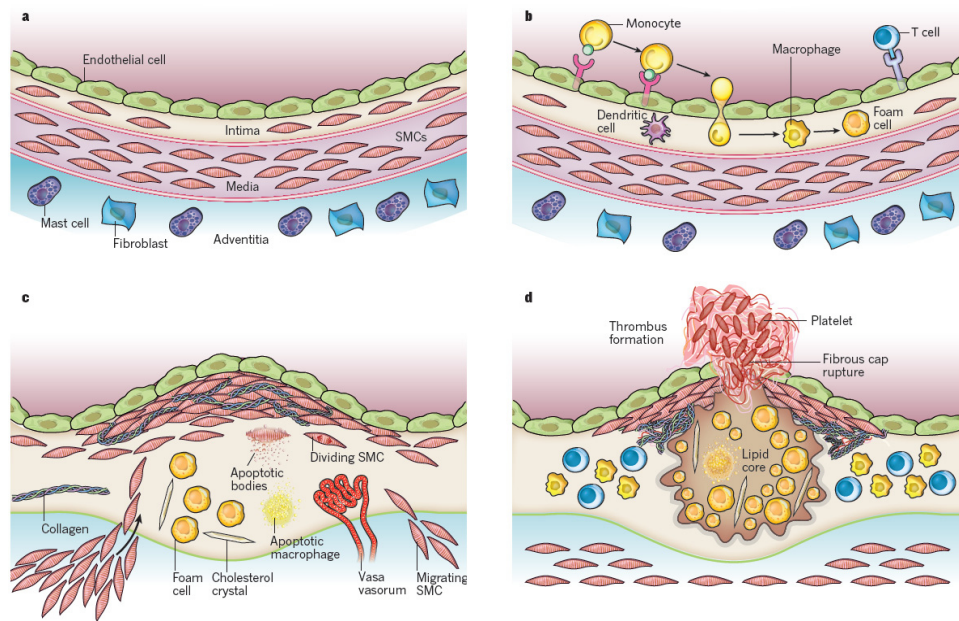


Abbildung 2: Entstehung einer arteriosklerotischen Plaque (mit freundlicher Genehmigung von³⁵⁾

Im Normalzustand fungiert das Endothel als Barriere zwischen dem intra- und extravasalen Raum (a). Durch bestimmte Einflussfaktoren wird die Integrität des Endothels gestört, dadurch wird die Permeabilität erhöht und die Ausprägung von Adhäsionsmolekülen beeinflusst (b). Dies führt zur Einwanderung SMCs und Makrophagen in die Tunica intima. Dort wird der nekrotische Kern der Plaque durch von Makrophagen aufgenommene oxLDLs gebildet(c). Mit der Ruptur der äußeren Plaquehülle tritt der nekrotische Kerninhalt in Kontakt mit Blutkomponenten und es kommt zur Aktivierung von Thrombozyten und einhergehend damit zur Thrombusbildung.

2.3. Duale antithrombozytäre Therapie

Thrombozyten, in Zusammenarbeit mit dem Gerinnungssystem, sind der Initiator für die Entstehung eines arteriellen Thrombus, z.B. nach Ruptur einer atheromatösen Plaque in einer Koronararterie, und stellen mit der Blockade ihrer Rezeptoren den zentralen Ansatzpunkt der aktuellen antithrombozytären Therapie dar.

Die Standardtherapie eines Patienten mit akutem Myokardinfarkt ist die perkutane transluminale Koronarangiographie mit Stentimplantation. Nach Stentimplantation werden die Patienten für eine gewisse Zeit mit einer dualen antithrombozytären Therapie behandelt. Die heutige Standardtherapie post Stent-Implantation: Acetylsalicylsäure als ein Thromboxan A₂ – Hemmer, wird mit dem Thienopyridin, zweiter Generation, „Clopidogrel“, einem Adenosin-Diphosphat P2Y₁₂-Hemmer, als Prävention einer Stentthrombose verabreicht³⁹. Diese Kombination wird entsprechend den Leitlinien je nach Klasse und

Evidenzgrad des Myokardinfarktes durch β -Blocker, ACE-Hemmer und Statine ergänzt⁴⁰.

Als Vertreter der ersten Generation der Thienopyridine wurde ab 1978 „Ticlopidin“ verwendet. Jedoch traten bei einigen Patienten in Folge der Behandlung diverse Nebenwirkungen, wie aplastische Anämie⁴¹, Neutropenie⁴², und eine thrombotisch thrombozytopenische Purpura^{41,43} auf. Ab 1997 etablierte sich die Verwendung des Thienopyridins Clopidogrel. Mittlerweile sind weitere Vertreter der Thienopyridine, wie „Ticagrelor“ und „Prasugrel“ in Verwendung. Insbesondere Prasugrel hat sich als Alternative für Clopidogrel-*low-responder* etabliert und wird aktuell bei Patienten mit Stentimplantation im akuten Koronarsyndrom als Standardtherapie eingesetzt⁴⁴. Unter Prasugrel-Therapie zeigte sich zwar ein etwas erhöhtes Blutungsrisiko im Gegensatz zu Clopidogrel, jedoch traten signifikant weniger Stent-Thrombosen auf⁴⁵.

Je nach Stentart, die eingesetzt wird und Art der behandelten Stenose, variieren die Empfehlungen für die Dauer der Einnahme des jeweiligen Thienopyridins zu dem lebenslänglich empfohlenen Aspirin, zwischen 6 und 12 Monaten^{40,46,47}.

Ein kritischer Punkt ist die Zunahme der Blutungsneigung von 20-60% unter antithrombozytärer Therapie^{45,48}. Daher besteht ein großes Interesse die molekularen Mechanismen der arteriellen Thrombose besser zu verstehen, um somit Hinweise für bessere therapeutische Ansätze zu schaffen, die das Risiko der erhöhten Blutungsneigung auf ein minimales Maß reduzieren.

Zusätzlich zur antithrombozytären Therapie wird den Patienten empfohlen die kardiovaskulären Risikofaktoren zu reduzieren, indem sie das Rauchen einstellen, körperliche Bewegung erhöhen und damit einhergehend eine Reduzierung des Körpergewichtes anstreben. Eine bestehende arterielle Hypertonie und eine Hyperlipidämie werden entsprechend den Leitlinien therapiert.

3. Arterielle Thrombose

3.1. Definition

Arterielle Thrombose ist charakterisiert durch ein intravasal gefäßverschließendes Blutgerinnsel⁴⁹. Dieses kann entweder durch Endothelläsionen (Denudation des Endothels) oder durch die Ruptur der fibrösen Kapselhülle einer arteriosklerotischen Plaque entstehen. Das Freilegen der Strukturproteine der extrazellulären Matrix z.B. fibrilläres Kollagen führt zur Thrombozytenaktivierung und leitet die Gerinnungskaskade ein. Dieser Mechanismus wird auch als Atherothrombose bezeichnet. Arterielle Thrombose kann somit als pathologische Abweichung der physiologischen Hämostase bezeichnet werden⁴⁹. Denn es kommt zwar zum Verschluss der Gefäßläsion, doch diese führt letztendlich zu klinischen Komplikationen, indem das arterielle Blutgerinnsel den Blutfluss unterbindet und eine Ischämie des zu versorgenden nachfolgenden Gewebes auslöst. Der sich aufbauende Thrombus entsteht durch Zell-Zell-Interaktionen zwischen Endothelzellen, Thrombozyten und Vertretern der Leukozyten, die von einem Fibrinnetzwerk umgeben sind, sowie der Beteiligung von Chemokinen und Zytokinen und der Ausbildung diverser Adhäsionsmoleküle.

3.2. Bisherige Erkenntnisse zur Entstehung arterieller Thrombose

3.2.1. Bedeutung des Endothels

Im intakten Zustand fungiert das Endothel als Barriere zwischen dem intra- und extravasalen Raum. Antithrombogene und vasoaktive Substanzen wie zum Beispiel Prostazyklin (Prostaglandin I₂, PGI₂), Stickstoffmonoxid (NO) und die Ektonukleotidase CD 39 werden vom Endothel abgegeben und dienen als physiologische Plättchenhemmer. Stickstoffmonoxid ist ein endogener Vasodilatator, der die Ausbildung von endothelialen proatherosklerotischen Adhäsionsmolekülen, wie VCAM-1 an der Zelloberfläche unterbinden kann⁵⁰ und somit antithrombogen wirkt. Prothrombogene Blutzellen wie Plättchen und Leukozyten bedürfen einer Zell-Zell-Interaktion mit dem Endothel um die Entwicklung eines arteriellen Thrombus initiieren zu können. Unterstützend für die antithrombogene Funktion des Endothels ist zusätzlich das auf der Zelloberfläche von Endothelzellen exprimierte Glykoprotein CD39⁵¹, eine

ADPase, welche verhindert, dass Adenosindiphosphat (ADP) an die thrombozytenständigen Rezeptoren P2Y₁ und P2Y₁₂ bindet. Zudem können Thrombozyten nicht an das intakte Endothel binden, da dessen Glykokalix im intakten Zustand keine Thrombozyten sensiblen Rezeptoren besitzt.

Kommt es jedoch durch die Ruptur einer arteriosklerotischen Plaque zur Unterbrechung der Endothelintegrität, tritt die thrombogene, subendotheliale Matrix in Kontakt mit zellulären Blutbestandteilen. Zudem ändert das angrenzende Endothel seine Oberflächenkonformität und bildet gezielt Adhäsionsmoleküle und Zytokine zur Rekrutierung von Thrombozyten und Leukozyten aus. Durch die Unterbrechung der Endothelschicht kommt es zur Ausschüttung von Serotonin und Thromboxan, die vasokonstriktiv an der glatten Muskulatur der Gefäßwand wirken und damit den Blutfluss an der Stelle verlangsamen und den Verschluss des Endothelschadens durch die Bildung eines Thrombozytenaggregates einleiten. Durch die Freisetzung des Gewebefaktors (Faktor III = Thromboplastin) wird die Aktivierung der Gerinnungskaskade über den Faktor X eingeleitet. Das Endothel bildet in diesem Zusammenhang noch mitunter Thrombospondin und von-Willebrand-Faktor (vWF) aus. Der vWF kommt neben der subendothelialen Matrix auch in den α -Granula von aktivierten Thrombozyten vor⁵². Dieser bildet, wie im Nachfolgenden beschrieben, die erste Kontaktstelle zwischen den Thrombozyten und der subendothelialen Matrix.

3.2.2. Beteiligung der Thrombozyten

Thrombozyten sind maßgeblich an der Entstehung eines arteriellen Thrombus beteiligt. Der Prozess aus Anheftung, Aktivierung und Akkumulation führt zum primären Verschluss der Gefäßläsion und ist gekennzeichnet durch komplexe Rezeptor-Liganden-Bindungen. Im Zuge der Plaqueruptur wird die Endothelschicht unterbrochen und das Blut kommt in Kontakt mit der subendothelialen extrazellulären Matrix (ECM). Diese besteht aus einem Netzwerk von Kollagenfibrillen, welches mit seinen verschiedenen Proteoglykanen und Glykoproteinen Adhäsionsstellen für Thrombozyten exprimiert. Der vWF stellt die primäre Bindungsstelle für anheftende Thrombozyten dar⁵³.

Die Anheftung der Thrombozyten wird primär über den Rezeptorkomplex (GPIb-V-XI) für vWF und dem Glykoprotein VI für freigelegte Kollagenfasern

vermittelt. Erst kürzlich wurde dem Rezeptor CLEC-2 (C-type like lectin-like type II transmembrane receptor) eine Bedeutung für die Thrombozytenaktivierung zugeschrieben⁵⁴. Die Bedeutung des GPVI-Rezeptors konnte anhand von GPVI-defizienten Mäusen, bei denen es zu keiner Thrombozytenanbindung kam, belegt werden⁵⁵. Unterstützend konnten Dubios et al. zeigen, dass freigelegtes Kollagen die Plättchenaktivierung auslöst⁵⁶. Im GPIb-V-XI Rezeptorkomplex bindet eine der vier Untereinheiten des Rezeptors, die GPIb α -Einheit, die zusammen mit Fibronectin und Laminin einen Rezeptorkomplex als molekulare Brücke bildet⁷. Dadurch ist eine Anbindung selbst bei hohen Scherkräften möglich. Durch die beiden Rezeptoren GPIb und GPVI ändert sich die Konformation bestimmter Integrine. Zu den wichtigen Integrinen zählen $\alpha_{IIb}\beta_3$ und $\alpha_1\beta_3$, die die Anbindung der Thrombozyten an die subendotheliale Matrix irreversibel machen⁵⁵. GPIIb-IIIa ist ein thrombozytenständiger Fibrinogenrezeptor, der neben Fibrinogen Bindungsaffinitäten für Fibrin, vWF, Thrombospondin, Fibro-, Vitro- und Retronectin besitzt. Das Integrin $\alpha_2\beta_1$ spielt hingegen nur eine unterstützende, aber keine essentielle Rolle in der Interaktion zwischen dem freigelegten Kollagen und den Thrombozyten⁵⁷. Zu weiteren Integrinen der Thrombozyten zählen, $\alpha_5\beta_1$ (VLA-5), $\alpha_6\beta_1$ (VLA-6), welche Fibronectin und Laminin binden können. Aus der Gruppe der β_3 -Integrine, $\alpha_5\beta_3$, welches Vitronectin, Fibronectin und Osteopontin binden kann⁵⁸.

Ausgelöst durch den Adhäsionsprozess folgt die Aktivierung der Thrombozyten. Dabei werden Stoffe, wie ADP, Serotonin und Thromboxan A₂, aus den α -Granula freigesetzt, wodurch sich die Form der Thrombozyten verändert, sie Pseudopodien ausbilden und weitere Zellen gebunden werden⁵⁹.

Die Aktivierung der Thrombozyten kann zum einen durch den zuvor beschriebenen Kollagen-induzierten Weg eingeleitet werden, aber zum anderen auch über Gewebefaktor. Dieser benötigt zur Thrombozytenaktivierung keine Endothelunterbrechung und ist unabhängig von vWF und Glykoprotein VI. Damit sich die aggregierten Thrombozyten besser miteinander verzahnen können, kommt es zur Konformationsänderung. Dabei verändert sich die scheibenähnliche, glatte Form der Thrombozyten zu einer Kugelform. Auf dieser Oberfläche bilden sich sogenannte Pseudopodien aus⁷. Erst durch diese Formveränderung wird das Glykoprotein GPIIb-IIIa auf der Oberfläche bereitgestellt. Dieser Rezeptor entsteht durch eine Umorganisation im Zytoskelett

der Thrombozyten. Im Aktin-Myosinkompartiment wird durch Ca^{2+} -Ionen globuläres in fibrilläres Aktin umgewandelt. Hier wird aus den α -Granula P-Selektin freigesetzt. P-Selektin ist ein Adhäsionsmolekül, welches auch in Endothelzellen vorkommt und im Zuge der Aktivierung, aus diesen freigesetzt wird. Es bindet an das auf Leukozyten exprimierte Adhäsionsmolekül PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand 1). Neben den α -Granula gibt es auch kompakte Granula, welche unter anderem ADP und Ca^{2+} enthalten. ADP kann auf der Zelloberfläche von Thrombozyten an die sogenannten P2Y_1 - und P2Y_{12} -Rezeptoren binden, und dadurch die Plättchenaktivierung stimulieren. Der nun bereitgestellte Rezeptor GPIIb/IIIa bindet Fibrinogen aus dem Plasma, sowie aus den aktivierten Thrombozyten freigesetztes Thrombospondin und Fibrinogen. Dadurch entsteht ein vernetztes Thrombozytengeflecht, auch bekannt als weißer Thrombus⁵⁹.

3.2.3. Gerinnungskaskade

Durch die Aktivierung der Gerinnungskaskade wird letztlich Fibrin gebildet, welches ein Gerüst für die aggregierten Thrombozyten schafft und so zur Stabilisierung des entstandenen primären Läsionsverschlusses im Gefäß führt⁵⁹.

Das Verständnis von der Blutstillung hat im Laufe der Jahre einen Paradigmenwechsel durchlaufen⁶⁰. 1964 wurde erstmals das Konzept der Gerinnungskaskade als schrittweiser enzymatischer Umbau vorgestellt^{61,62}, der in die extrinsische und die intrinsische Gerinnung unterteilt wurde. Damals war die Annahme, dass die Beteiligung der zellulären Hämostase unabhängig von der Plasmatischen abläuft⁶⁰. Heute geht man von einem umfassenderen Modell aus, indem es komplexe Verlinkungen zwischen der extrinsischen und der intrinsischen Gerinnung gibt⁶⁰. Zusätzlich sorgt der Organismus im physiologischen Zustand dafür, dass die Gerinnung unterbunden wird, indem die einzelnen Faktoren in Form von Proenzymen vorliegen und daher erst schrittweise aktiviert die Blutgerinnung auslösen können⁵⁹.

Die Kaskade der Gerinnung setzt sich aus verschiedenen miteinander verknüpften Aktivierungsschritten zusammen, die letztlich dazu führen, dass Fibrinogen durch Thrombin zu Fibrin umgewandelt wird. Der alleinige Auslöser der Fibrinformierung ist der Gewebefaktor⁶³. Dieser kann zum einen durch den Verlust der Gefäßintegrität und zum anderen auch ohne die Unterbrechung des

Endothels entstehen. Laut Furie et al. gibt es einen zweiten Weg neben dem durch Kollagen induzierten Weg, der die Thrombozyten aktiviert. Bei diesem geht man davon aus, dass ein verschlüsselter inaktiver Gewebefaktor, der von Monozyten exprimiert wird, oder in aktiver Form in der Gefäßwand vorkommt durch das Enzym Proteindisulfid-Isomerase (PDI) aktiviert wird. Die Komplexbildung mit dem Faktor VIIa führt somit zur Fibrinbildung⁶³. PDI wird aus aktivierten Endothelzellen und Thrombozyten im Bereich der entsprechenden Gefäßverletzung freigesetzt⁶⁴ und wird für die Fibrinbildung und Thrombusformierung benötigt⁶³. Die Annahme bestand, dass das Endothel als Barriere zwischen dem interstitiellen Faktor VIIa und dem intravasalen Gewebefaktor (Faktor III) fungierte, weil erst durch den Gewebefaktor Faktor VII zu VIIa aktiviert werden konnte⁶⁵. Dieser Faktor VIIa kann dann wiederum VII mit dem Gewebefaktor zu VIIa aktivieren. Dieser Prozess wird Gewebefaktor-Autoaktivierung genannt⁶⁶. Nach der Aktivierung von VIIa versetzt dieser den Faktor X und Faktor IX, die jeweils Komplexe bilden, in einen aktiven Zustand. Letztendlich wird durch die Komplexbildung Prothrombin (Faktor II) zu Thrombin (Faktor IIa) katalysiert, welches Fibrinogen zu Fibrin umwandelt. Fibrin fungiert als Stabilisator des Thrombozytenaggregates, welches die Gefäßläsion primär verschließt⁵⁹.

3.2.4. Beitrag von Leukozyten zur arteriellen Thrombose

Leukozyten sind als Vertreter des angeborenen Immunsystems entscheidend an der Entwicklung eines arteriellen Thrombus beteiligt. Im Zuge der Plaqueruptur werden neutrophile Granulozyten und Monozyten durch aktivierte Endothelzellen und Thrombozyten angelockt. Eine besondere Rolle nehmen hierbei die neutrophilen Granulozyten ein, die unter anderem durch die Ausbildung sogenannter Neutrophil Extracellular Traps lokal Pathogene bekämpfen können^{67,68}.

Im Zuge der chronischen Entzündung im Kern arteriosklerotischer Plaques, werden Endothelzellen durch die eingelagerten Lipide stimuliert und bilden vermehrt Adhäsionsmoleküle zur Rekrutierung von Thrombozyten und Leukozyten aus. Monozyten gehören zu den ersten Vertretern der Leukozyten, die in Bereichen solcher Entzündungsherde auftreten. Durch einen komplexen Prozess aus Endothelanheftung, Rollen, Aktivierung, Adhäsion und Transmigration kommt es zur Ansammlung im extravasalen Gewebe⁶⁹.

Die Ruptur einer arteriosklerotischen Plaque führt durch exprimierte Adhäsionsmoleküle wie P-Selektin ebenfalls zur Rekrutierung von Monozyten und neutrophilen Granulozyten. P-Selektin wird auf der Oberfläche von aktivierten Thrombozyten und Endothelzellen exprimiert⁷⁰. So konnten Dong und Burger et al. zeigen, dass Mäuse mit einer Mutation für die Ausbildung von P-Selektin eine deutlich verzögerte arteriosklerotische Thrombusformierung aufwiesen^{71,72}. Der auf neutrophilen Granulozyten exprimierte PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand 1) bindet an das P-Selektin der Thrombozyten und der Endothelzellen. Dadurch kommt es zu einer Aktivierung der neutrophilen Granulozyten, die daraufhin MAC-1(CD11/CD18) exprimieren, welches ICAM-1 auf aktivierten Endothelzellen und GPIb auf aktivierten Thrombozyten binden kann⁷³.

Inwieweit Vertreter der Leukozyten, insbesondere neutrophile Granulozyten und ihre ausgebildeten NETs, eine Rolle an der Formierung eines arteriellen Thrombus spielen, ist Teil dieser Arbeit.

4. Neutrophil Extracellular Traps (NETs)

4.1. Definition

Im Jahr 2004 konnten Brinkmann et al. zeigen, dass neutrophile Granulozyten außerhalb ihrer Zellstruktur durch sogenannte extrazelluläre Netze (Neutrophil Extracellular Traps – NETs) Pathogene inaktivieren können⁷⁴. Es wird angenommen, dass NETs als eine frühe Form des Zelltods oder als eine Form der DNA-Extrusion⁷⁵ von intakten, aktivierten neutrophilen Granulozyten gebildet werden können. Damit können sie als Zellen des angeborenen Immunsystems Pathogene inaktivieren⁷⁴.

4.2. Entstehung und Struktur

Die Entstehung von NETs wird als NETosis⁷⁶ bezeichnet und unterscheidet sich dahingehend von nekrotisch oder apoptotisch zugrunde gehenden Zellen, dass hierbei die Kernhülle nicht zerstört wird⁶⁷. Kürzlich konnte jedoch auch gezeigt werden, dass NETs von im Anschluss noch lebensfähigen Zellen gebildet werden können⁷⁷. Dies geschah nach voran gegangener Stimulation mit *Staphylococcus aureus* für einen Zeitraum von 5-60 Minuten. Weitere Untersuchungen zur NETs-Bildung *in vivo* geben Anlass zu der Annahme, dass die Zellen im Anschluss nicht

zugrunde gehen, sondern weiterhin eingeschränkt funktionstüchtig bleiben. Yipp et al. kamen zu dieser Annahme, da sie beobachteten, dass NETs bildende neutrophile Granulozyten ein abnormes intravaskuläres *crawling* zeigten, welches charakterisiert war durch die Ausbildung unregelmäßiger Pseudopodien und eine Hyperpolarisation der Zellen⁷⁸. In vorherigen *in vitro*-Untersuchungen fand die Formierung von NETs in einem Zeitraum von 3-4 Stunden nach dem Stimulus statt und die Zellen gingen im Anschluss zugrunde⁷⁴.

Nach dem aktuellen Kenntnisstand zählen diverse Bakterien, Pilze, Einzeller und Viren zu den Auslösern für NETosis. Neben Mikroorganismen sind auch chemische Faktoren wie ROS⁶⁷, Lipopolysaccharide, Antikörper⁷⁹, Antigen-Antikörper-Komplexe^{80,81} und durch TLR 4 aktivierte Thrombozyten⁷⁵ in der Lage die NETs-Bildung von neutrophilen Granulozyten auszulösen.

Brinkmann et al. zeigten, dass NETs innerhalb von 10 Minuten nach der Zellaktivierung der neutrophilen Granulozyten durch die Bindung des Counterrezeptors PSGL-1 an P-Selektin, gebildet werden⁸². Fuchs et al. zeigten, dass der neutrophile Granulozyt für die NETs-Bildung diverse Umbauvorgänge des Chromatins durchläuft, die schließlich in einer Auflösung der ursprünglichen Form resultieren und somit kommt es zu einer Durchmischung des Karyoplasmas mit dem Zytoplasma und die NETs-Komponenten können sich frei in der Zelle durchmischen. Dieser Prozess bedingt die Bildung von ROS durch NADPH-Oxidase. Patienten mit chronischer Granulomatose besitzen keine NADPH-Oxidase-Funktion und sind daher nicht in der Lage NETs auszubilden⁶⁷. Ein weiteres Enzym, welches an der Bildung von NETs, genauer an der Citrullinierung von bestimmten Histonen des Zellkernchromatins beteiligt ist, ist Peptidylarginine deiminase 4 (PAD 4)⁸³. Eine Beteiligung an der NETs-Bildung wird den Proteasen neutrophile Elastase und Myeloperoxidase, die den azurophilen Granula entstammen, zugesprochen, denn Mäuse mit einem Knockout für die Bildung von neutrophiler Elastase waren nicht in der Lage NETs auszubilden⁸⁴. Dies gilt auch für Patienten mit einer Mutation des MPO-Gens⁸⁵.

Interleukin-8 und Lipopolysaccharid (LPS) führten *in vitro* zur Entstehung von NETs⁷⁴. An diesem Aktivierungsprozess von neutrophilen Granulozyten und dem Initiierungsprozess der NETs-Bildung, sind verschiedene Rezeptoren, wie Toll-like-Rezeptoren, Fc-Rezeptoren und Zytokine, beteiligt. Zudem wird angenommen, NETs-Formierung abhängig ist von ROS, welche durch NADPH-

Oxidase gebildet werden^{67,86}. Jedoch gibt es auch Gegenannahmen, die ROS nicht als initiale Bedingung für die Bildung von NETs sehen, denn Chen et al. konnten zeigen, dass Immunkomplexe in Verbindung mit dem thrombozyten- und makrophagenständigen Rezeptor FcγRIIA (CD 32) zur alleinigen Bildung von NETs führen⁸⁷. Die Entschlüsselung weiterer Bildungsmechanismen ist Gegenstand aktueller Forschung.

Brinkmann et al. konnten durch spezifische Immunfärbungen zeigen, dass Neutrophil Extracellular Traps zu einem kleinen Anteil bestimmte Proteine aus den verschiedenen Granulaformen enthalten. Dazu zählen die neutrophile Elastase, Cathepsin G, Myeloperoxidase, Lactoferrin und Gelatinase. Zudem waren Antikörperfärbungen auf diverse Histone positiv. Der Hauptbestandteil, aus dem NETs bestehen ist hingegen DNA⁷⁴.

4.3. Funktion von NETs

NETs werden von neutrophilen Granulozyten gebildet und sind somit Teil des angeborenen Immunsystems. In verschiedenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass NETs in der Lage sind Bakterien zu töten und deren Verbreitung zu unterbinden⁷⁴. Neutrophile Elastase degradiert die Virulenzfaktoren von gram-negativen Bakterien⁸⁸ und ist somit ein zentrales Funktionselement in der Bakterienabwehr. In Untersuchungen zur Rolle von NETs unter septischen Bedingungen zeigten McDonald et al., dass humane NETs initiiert durch die LFA-1-abhängige Interaktion von Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten intravaskulär vorkommende Bakterien immobilisieren⁸⁹. Wurde zuvor die NETs - Degradierung mit DNase ausgelöst, sank auch einhergehend mit der Verminderung der Anzahl an NETs die Summe der gefangenen Bakterien. NETs, die zur Pathogenbekämpfung in den Lebersinusoiden unter septischen Bedingungen gebildet wurden, verursachten einen deutlichen Gewebeschaden⁸⁹. Wichtige Erkenntnisse zur genauen Interaktion zwischen Thrombozyten und der Aktivierung von neutrophilen Granulozyten gelang Clark et al., die nachweisen konnten, dass LPS alleine, auch in hohen Konzentrationen keine NETosis auslösen konnte. Dies war erst durch die LPS vermittelte Bindung an den TLR 4-Rezeptor der Thrombozyten möglich⁷⁵.

Ein weiterer Funktionsbereich von NETs ist die Beteiligung an der Stabilisierung der venösen und arteriellen Thrombose. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt

werden, dass NETs an Thrombozyten binden und diese im Zuge der tiefen venösen Thrombose aktivieren können⁶⁸. Des Weiteren konnten Massberg et al. nachweisen, dass neutrophile Elastase als Bestandteil von NETs, prokoagulierend wirkt⁹⁰. Neutrophile Elastase degradiert und hemmt das antikoagulatorische Molekül TFPI (*Tissue factor pathway inhibitor*) und trägt somit zur Thrombusstabilisierung bei⁹⁰. Weitere thrombusstabilisierende Mechanismen von NETs, sind die Aktivierung von FXII zu FXIIa⁹¹ und die Aktivierung der Toll-like-Rezeptoren 2 und 4 durch die in NETs enthaltenen Histone⁹²⁻⁹⁴. Zudem konnte gezeigt werden, dass NETs an thrombusstabilisierende Plasmaproteine, wie vWF, Fibrin und Fibrinogen binden⁶⁸. Neben der Degradierung der NETs durch DNase⁹⁵ führt auch Heparin zu einer Desintegration von NETs⁶⁸. Des Weiteren kann die Ausbildung von NETs durch einen PAD-Inhibitor, wie z.B. Cl-amidine unterdrückt werden⁹⁶.

Inwieweit NETs darüber hinaus an weiteren Mechanismen der Immunabwehr und der Thrombusstabilisierung beteiligt sind, ist Inhalt aktueller Forschungsprojekte.

5. Zielsetzung

Durch die Generierung von arteriellen Thromben aus zwei verschiedenen Mausmodellen, sollte untersucht werden, welches der gängigen *in vivo*-Maus-Modelle für die Entstehung von arterieller Thrombose, sich am besten für den Vergleich mit humanen Thromben von Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt eignet.

Durch verschiedene histologische Färbungen von murinen Thromben des passendsten Mausmodells und humanen koronaren Thromben sollten dann Übereinstimmungen bzw. Unterschiede in der Thrombuszusammensetzung zwischen Maus und Mensch untersucht werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es mit dem geeignetsten murinen arteriellen Thrombose-Modell die funktionelle Bedeutung der NETs bei der Entstehung der arteriellen Thrombose zu untersuchen, um dadurch eventuell mögliche neue Ziele für neue Therapieansätze der arteriellen Thrombose zu finden.

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Rekrutierung von Patienten und Gewinnung humaner Thromben

In dieser Studie wurden Patienten eingeschlossen, bei denen entweder aufgrund typischer klinischer Symptome, laborchemisch erhöhter Myokardmarker oder EKG-Veränderungen die Indikation zur Herzkatheteruntersuchung bestand und bei denen sich in der Herzkatheteruntersuchung ein thrombotischer Verschluss einer Koronararterie zeigte. In allen Fällen wurde aus medizinischen Gründen die Entfernung des thrombotischen Materials aus der Koronararterie mittels eines Extraktionskatheters (Pronto™ Extraktionskatheter, Vascular Solutions, Minneapolis, USA) durchgeführt. Die entnommenen Blutgerinnsel wurden direkt vor Ort in Eppendorfgefäße (Eppendorf Tubes®, 5 ml) überführt, anschließend in flüssigem Stickstoff (-196°C) schockgefroren und schließlich bei -80°C konserviert. Für die Studie lag ein positives lokales Ethikvotum vor. Von allen Patienten wurde ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an der Studie eingeholt.

1.1. Definition des Thrombusalters

Das Thrombusalter wurde als Zeitraum zwischen den ersten, subjektiv vom Patienten empfundenen, Symptomen und dem Zeitpunkt der Thrombusentnahme während der Herzkatheteruntersuchung definiert.

2. Gewinnung muriner Thromben

Die murinen Thromben wurden aus zwei verschiedenen etablierten *in vivo*-Mausmodellen an der A. carotis communis, caudal der Bifurkation zur A. carotis interna und A. carotis externa, gewonnen. Diese Versuche sind durch entsprechende Tierversuchsanträge durch die Regierung von Oberbayern genehmigt worden.

2.1. Verwendete Versuchstiere

Bei dem im Folgenden für die beschriebenen Versuche, verwendeten Inzucht-Mausstamm, handelt es sich um C57BL/6J (JAX™ Mice Strain). Dieser wurde über Jackson Laboratories, Inc. bezogen. Die Versuchstiere waren zwischen 8 bis

14 Wochen alt und wurden dazu vom Gewicht und vom Geschlecht gleichermaßen passend in den Versuch genommen.

2.2. Haltungsbedingungen der Tiere vor dem Versuch

Die Unterbringung der Tiere erfolgte, nach Geschlecht getrennt, in Gruppen von bis zu 4 Tieren. Dies war selbst bei männlichen Geschwistertieren möglich. Einzige Ausnahme der Gruppenhaltung, galt für ältere Zuchtböcke ohne Geschwister, denn hier bedeutete die gegenseitige Verletzungsgefahr für das einzelne Tier einen höheren Stressfaktor. Die Tiergruppen wurden in Käfigen (Typ II, TECNIPLAST, Hohenpeißenberg) in einem speziellen Schrank (Ventilated Cabinet, TECNIPLAST, Hohenpeißenberg) gehalten. Die Käfige waren mit einer Einstreu aus Holzspänen ausgelegt und den Tieren wurde als Enrichment, ein Papphäuschen und Wolle geboten. Der Schrank konnte gesondert belüftet werden und besaß eine rotgefärbte Plexiglasscheibe, die für die Mäuse undurchsichtig war, und sie somit einer stressfreien, ruhigen Atmosphäre aussetzte. Aufgrund dieser Scheibe, war es möglich, die Tiere jederzeit kontrollieren zu können ohne, dass die einzelnen Käfige herausgenommen werden mussten. Zudem hatten die Tiere stets Zugang zu pelletiertem Spezialfutter und Wasser.

Am Lieferungstag wurden die Tiere in ihre neuen Käfige eingesetzt und dann erst nach einer Woche in den Versuch genommen, um somit vorzubeugen, dass der Transportstress, Einfluss auf den Versuchsablauf und die Ergebnisse nehmen konnte.

Bei allen Versuchen war der wichtigste Aspekt die vorschriftsmäßige Versorgung und Betreuung der Versuchstiere nach dem aktuellen Tierschutzgesetz. Dies bedeutete zu jeder Zeit sicherzustellen, dass die Tiere bei entsprechendem Bedarf analgetisch abgedeckt waren und durch geschultes routiniertes Handling das Stresslevel der Tiere zu jeder Zeit so niedrig wie möglich zu halten war.

2.3. Narkose und weitere OP-Vorbereitungen

Die Versuchstiere sind vor der jeweiligen Operation durch eine intraperitoneal gespritzte Kombination aus einem Opioid, Benzodiazepin und einem Alpha-2-Adrenozeptor-Agonisten narkotisiert worden. Die Narkoseeinleitung erfolgte mit einem Inhalationsanästhetikum, 4%iges Isofluran - Sauerstoffgemisch (Forene 100%, Abbot, Wiesbaden), sodass eine progressive Reduzierung des

Bewusstseins, der Schmerzempfindung und des Muskeltonus stattfand. Anschließend wurde den Tieren die Kombination aus Fentanyl (Fentanyl Hexal[®], Hexal, Holzkirchen), Medetomidin (Dorbene vet[®], Zoetis, Wien) und Midazolam (Midazolam-hameln, hameln, Hameln) intraperitoneal injiziert. Damit waren die Auslöschung der Schmerzempfindung, des Bewusstseins und die vollständige Muskelrelaxation gegeben. Die Kombination wurde gewählt, da eine optimale und ausreichende Abdeckung nicht durch eine Monopräparatgabe erreicht werden kann. Fentanyl ist ein Vertreter der Opioide und führt als Vollagonist am μ -Rezeptor zu einer supraspinalen ($\mu 1$) und spinalen ($\mu 2$) Analgesie. Ebenso reduziert es die durch thermische oder chemische Stimuli verursachte Nozizeption⁹⁷. Medetomidin gehört zu den Alpha-2-Adrenozeptor-Agonisten und unterstützt in Kombination mit Fentanyl und Midazolam die optimale Sedierung. Midazolam gehört zur Gruppe der Benzodiazepine und wirkt sedierend und zentral muskelrelaxierend⁹⁸. Ein Vorteil dieser Kombination ist die Aufhebungen aller Sinneswahrnehmungen und anschließende Möglichkeit der vollständigen Antagonisierung der einzelnen Substanzen. Diese wurde für die im Weiteren beschriebenen Tiermodelle nicht genutzt, da es sich um akute Versuche handelte, bei denen die Tiere im Anschluss an die Operation getötet wurden. Sobald sich die Tiere im Stadium der Toleranz befanden und keine Flexorreflexe auslösbar waren, wurde das OP-Feld vorbereitet. Dazu wurden sie im Bereich des ventralen Halses rasiert (Ermila Handy, Wahl, Unterkirnach) und anschließend wurden in diesem Bereich die Haare mit einer Enthaarungscreme (asid[®]-med Enthaarungscreme, ASID BONZ, Herrenberg) entfernt.

Während der Operation wurden die Mäuse mit einem 0,8%igem Isofluran-Sauerstoffgemisch über eine Kopfkammer versorgt. Da Midazolam eine Atemdepression bis zu kurzzeitigen Apnoephasen auslösen kann, war der Einsatz dieser Substanz zur alleinigen Aufrechterhaltung der Narkose nicht sinnvoll⁹⁹. Um dem Vorzubeugen, wurden die Tiere konstant durch den Versuch, wie bereits beschrieben, mit einem volatilen Anästhetikum-Sauerstoffgemisch beatmet. Zudem wurden die Augen der Tiere mit Augensalbe (Bepanthen[®] Augensalbe, Bayer, Leverkusen) vor dem Austrocknen geschützt und die Körper in Rückenlage auf einer Wärmeplatte fixiert und auf einer konstanten Temperatur von 37°C gehalten. Denn die Verabreichung von Medetomidin kann zu einer Absenkung der Körpertemperatur führen¹⁰⁰. Zur Fixierung wurden die

Gliedmaßen der Tiere locker mit Klebeband (TransporeTM Medizinisches Pflaster, 3M Medica) an der Wärmeplatte befestigt, um eine fixe Haltung des Tieres zu jeder Zeit zu gewährleisten. Abschließend wurde das OP-Feld mit einem Hautantiseptikum (Kodan[®], Schülke, Norderstedt) desinfiziert.

Das für die OP verwendete Besteck, wurde vor der Operation für mindestens 20 Minuten in einem Desinfektionsbad (40 ml Sekusept[®] PLUS, ECOLAB, Monheim am Rhein, auf 1Liter Wasser), nach vorheriger Reinigung, desinfiziert.

Die zu Anfang eingeleitete Kombinationsnarkose hat eine Wirkungsdauer von 45 – 60 min, sodass während der OP regelmäßig die Flexorreflexe und die Atemfrequenz kontrolliert wurden und die Narkose mindestens stündlich mit der halben Anfangsdosis subkutan nachdosiert wurde. Des Weiteren wurde bei Bedarf zusätzlich die individuell erforderliche Konzentration des Isofluran-Sauerstoffgemisches angepasst.

2.4. *In vivo*-Maus-Modelle der arteriellen Thrombose

Für diese Studie wurden zwei etablierte *in vivo*-Maus-Modelle der arteriellen Thrombose durchgeführt, das Drahtdenudationsmodell und das Eisen-III-Chlorid-Modell^{4,101}. Dabei wurden die gewonnenen Thromben aus beiden Modellen direkt mit den humanen Thromben makroskopisch und mikroskopisch verglichen, um im Anschluss das Modell mit den meisten Übereinstimmungen als das direkte Vergleichsmodell zu den humanen Thromben zu bestimmen. Makroskopisch war von Bedeutung, dass durch das entsprechende Mausmodell große, kompakte und gefäßverschießende Thromben entstehen. Diese Vergleichbarkeit wurde letztendlich durch das Eisen-III-Chlorid-Modell am besten erreicht.

2.4.1. Drahtdenudations-Modell

Diese Methode wurde wie nach Lindner et. al. beschrieben durchgeführt⁴. In diesem Modell wird die Gefäßverletzung im Gegensatz zum Eisen-III-Chlorid-Modell intravasal erzeugt. Dazu wurde die A. carotis communis dextra und sinistra, mit den beiden Gabelungsästen A. carotis externa und interna, freipräpariert. Die A. carotis communis und die A. carotis interna wurden vorab temporär ligiert. Der Zugang für die Verletzung im Bereich der A. carotis communis erfolgte von kranial über die A. carotis externa. Dazu wurden dieser proximal und distal von der Bifurkation mit einem nicht resorbierbaren Faden (8-0 Prolene - Polypropylene, Ethicon[®]) Schlaufen gelegt. Die distale Schlaufe

wurde festgezogen bevor zwischen den beiden Schlaufen dann der Gefäßschnitt gesetzt wurde. Über diesen wurde dann ein Draht (Hi-Torque FLOPPY II Guide Wire 0,014“, Abbott) bis zur temporären Ligatur der A. carotis communis eingeführt und 3 mal entlang der Gefäßwand vor- und zurückgeschoben⁴.

Nach der Entfernung des Drahtes wurde die proximale Schlaufe der A. carotis externa ebenfalls zugezogen, um Blutaustritt durch die Inzisur zu verhindern. Im Anschluss, wurde dann jeweils, wie bei der oben beschriebenen Methode, 3 oder 6 Stunden abgewartet und die Maus im Anschluss getötet und der Teilabschnitt der A. carotis communis mit dem Thrombus entnommen und in flüssigem Stickstoff konserviert.

2.4.2. Eisen-III-Chlorid-Modell

Um eine Thrombusbildung auszulösen, wurde bei diesem Modell, eine Gefäßverletzung durch extravasal appliziertes Eisen-III-Chlorid verursacht. Diese Methode wurde erstmals durch Fay et al. beschrieben¹⁰¹. Bei dieser Methode wurde eine transmurale Zellnekrose verursacht, die die Integrität des Gefäßendothels zerstörte³. Der genaue Pathomechanismus dieser Methode wurde unter anderem durch Woollard et al. genauer untersucht und beschrieben¹⁰². Das extravasal applizierte Eisenchlorid verursachte, durch den chemischen Stimulus, eine Freisetzung von Gewebethromboplastin auf der Zelloberfläche von Monozyten und Endothelzellen^{103,104}. Dies hat zur Folge, dass die extrinsische Gerinnungskaskade eingeleitet wird.

Woollard et al. zeigten, dass topisch appliziertes Eisenchlorid durch bestimmte Mechanismen bis hin zu einer intravasalen Endothelverletzungen führt und somit ein Thrombus entsteht. Eisenchlorid geht in das Gefäßlumen über und dadurch kommt es an der Zelloberfläche der Erythrozyten zu einer Proteinoxidation. Damit tritt eine Hämolyse der roten Blutzellen ein. Das dabei freigewordene Hämoglobin wird ebenfalls durch das Eisenchlorid oxidiert. Das oxidierte Hämoglobin setzt H_2O_2 , reaktive Sauerstoffspezies und Proteinradikale frei, wodurch wiederum lipophiles Häm freigesetzt wird. Diese redoxaktiven Substanzen erzeugen am Endothel einen initialen Schaden und damit kommt es zur Freilegung der subendothelen Matrix und somit zur Plättchenaktivierung und der Einleitung der Gerinnungskaskade¹⁰².

Im Detail wurde bei der zur OP vorbereiteten Maus, im desinfizierten OP-Feld,

median im Halsbereich, ein ca. 1,5 cm langer Hautschnitt gesetzt. Die darunter liegende Fettschicht und Muskelfaszien wurden vorsichtig entfernt, sodass es möglich war die A. carotis communis sinistra und dextra frei zu präparieren. Die A. carotis communis wurde kaudal der Bifurkation zur A. carotis interna und externa auf einer Länge von 0,5 cm freipräpariert. In diesem Bereich wurde dorsal die Arterie mit einer schwarzen Folie unterlegt, um das umliegende Gewebe später vor dem Eisenchlorid zu schützen (siehe Abbildung 3). Danach wurde der Arterienabschnitt getrocknet, sodass das im Anschluss applizierte Eisenchlorid nicht verdünnt wurde.

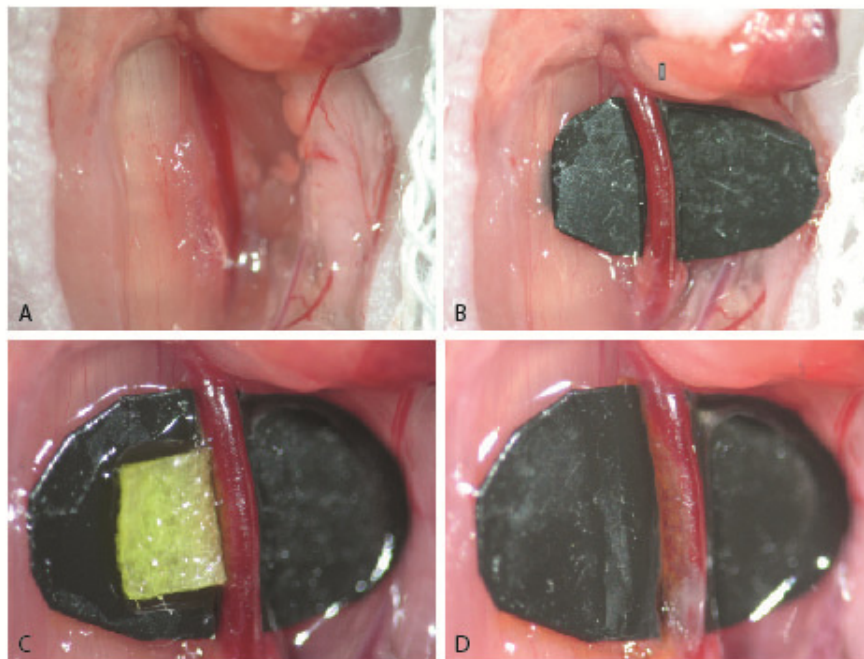


Abbildung 3: Extravasale Eisenchlorid-Applikation

Der oberen Rand aller Bilder ist die kaudale Ausrichtung des Tieres. Bild A zeigt die freipräparierte A. carotis communis, mit der nach lateral verlegten Glandula parotis im oberen rechten Bildrand. In Bild B ist die Arterie bereits mit der Folie unterlegt. Auf diese ist das in Eisenchlorid getränkte Filterpapier angelegt (C). Bild D zeigt den extravasalen Zustand der Arterie nach Entfernung des Filterpapiers.

Ein 1 x 2 mm zurechtgeschnittenes Filterpapier wurde in 10%iges Eisen-III-Chlorid getränkt und dann seitlich für 3 Minuten an die Arterie angelegt. Nach 3 Minuten wurde das Filterpapier entfernt und der Arterienbereich mit PBS (Dulbecco's Phosphate buffered saline, Sigma-Aldrich[®], Steinheim) gespült und der Thrombusbildung eine Zeit von 3 oder 6 Stunden gegeben.

Um einen genauen Überblick über die Flussgeschwindigkeit in dieser Zeit zu

bekommen, wurden die Gefäßvorgänge mittels der Intravitalmikroskopie (siehe Kapitel ‚Intravitalmikroskopie‘) sichtbar gemacht.

2.4.3. Schwanzveneninjektion

Die in dieser Studie verwendeten Enzyme, wie Cl-amidine und isolierte mit DCF angefärbte Thrombozyten, wurden den Mäusen über einen Schwanzvenenkatheter intravenös appliziert. Die intravenöse Applizierung erfolgte stets an narkotisierten Tieren.

Der Katheter bestand aus einer 30G Kanülenspitze (Microlance™, BD), die von dem Konusgehäuse abgetrennt wurde und in einen ca. 5-7 cm langen Schlauch (Polyethylen, Portex) geschoben wurde. Dieser wurde wiederum auf eine 30G Kanüle gesteckt.

Appliziert wurde langsam mittels einer 1 ml Spritze (Plastipak™, BD). Dies geschah unter stetiger Kontrolle der Atmung. Die 1 ml Spritze eignet sich am besten, um den Druck auf die Vene optimal regulieren zu können. Injiziert wurde entweder in die V. caudalis mediana dextra oder sinistra. Dazu wurde der Schwanz kranial kurz vor dem Ansatz zwischen Zeige- und Mittelfinger und kaudal zwischen dem Ringfinger und dem Daumen eingeklemmt. Damit wurde die jeweilige Vene angestaut und fixiert. Die ausgewählte Einstichstelle wurde mit einem Hautantiseptikum desinfiziert und die Kanülenspitze des Katheterschlauches wurde anschließend in die Vene eingeführt. Füllte sich der Schlauch rücklaufend mit Blut, war der Katheter richtig positioniert. Die zu applizierende Substanz wurde vor dem Einführen in die Vene, ohne die Bildung von Luftblasen, in den Katheter und die angeschlossene Spritze gefüllt. Das maximale Volumen, welches intravenös appliziert wurde, lag bei 0,3 µl pro Injektion. Nach der vollständigen Applizierung wurde die Kanülenspitze vorsichtig aus der Vene gezogen und die Einstichstelle bis zum Sistieren der Blutung komprimiert.

2.5. Thrombusentnahme

Im Anschluss an die Wartezeiten von einer, drei und sechs Stunden, wurden die jeweiligen Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und die A. carotis communis kaudal der Bifurkation und 0,5 cm kaudal dieser Stelle ligiert und das Teilstück mit dem entweder ein, drei oder sechs Stunden alten Thrombus entnommen. Die Thromben wurden in einem Einbettmedium (Tissue-Tek®,

Sakura, Alphen aan den Rijn, NL) fixiert und in ein Eppendorfgefäß (1,5ml) überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur Weiterverarbeitung wurden sie bei -80°C gelagert.

3. Intravitalmikroskopie

Die Intravitalmikroskopie ermöglicht es *in vivo*-Vorgänge in den Gefäßen durch das Anfärben von Blutzellen mit bestimmten Fluorchromen sichtbar zu machen. Die Versuche wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop (Olympus BX51WI Fluoreszenzmikroskop) durchgeführt.

3.1. Prinzip der IVM

Die Fluoreszenzmikroskopie beruht auf dem Prinzip, dass bestimmte Fluorochrome angeregt werden und deren Emissionslicht, die mit dem Fluorchrom markierten Zellen dadurch sichtbar macht. Wie durch Aesch et al. beschrieben, wird das Licht zur Anregung in einem Auflichtilluminator erzeugt. Dieser nutzt Hochdruckmetalllampen zur Erzeugung des benötigten Lichtes. Diese Lampen sind in der Lage besonders hohe Lichtintensitäten zu erzeugen. Das somit erzeugte Licht wird durch bestimmte Linsen gebündelt und auf einen sogenannten Anregungsfilter gelenkt¹⁰⁵. Anschließend trifft das Licht auf einen dichroitischen Teilerspiegel, der in einem 45° Winkel das Licht so ableitet, dass es auf das Präparat gelenkt wird. Das Licht, welches vom Teilerspiegel gebrochen wird, ist für diesen undurchlässig¹⁰⁶. Das mit einem Fluorchrom markierte Präparat nimmt das Anregungslicht auf. Im nächsten Kapitel ist genauer beschrieben, wie das hier genutzte Fluorchrom DCF das Anregungslicht umwandelt und Emissionslicht wieder abgibt. Das vom Fluorchrom abgegebene Licht ist dann durchlässig für den Teilerspiegel und kann ihn passieren und über einen nachgeschalteten Emissionsfilter geleitet werden¹⁰⁶. Das aus dem Emissionsfilter passierte Licht kann dann durch das Okular wahrgenommen werden und die markierten Strukturen in der Maus werden so sichtbar. Entscheidend dafür ist, dass der zu untersuchende Bereich kontinuierlich durch einen Wasserspiegel aus erwärmter NaCl-Lösung (Isotonische Kochsalz-Lösung, Braun, Melsungen) bedeckt ist. Denn das Wasser-Immersions-Objekt (20x, NA 0,95) benötigt eine kontinuierliche Wasseranbindung, um eine gute Bildqualität produzieren zu können. Die Videosequenzen des Fluoreszenzmikroskops (Olympus BX51, Hamburg) wurden über eine Digitalkamera (ORCA-ER CCD Kamera,

Hamamatsu) mittels einer Software (Cell[^]R, Olympus, Hamburg) angeschaut, bearbeitet und ausgewertet.

3.2. Verwendete Enzyme und Fluorochrome

Für die Intravitalmikroskopie wurden folgende Enzyme und Fluorochrome genutzt:

3.2.1. Cl-amidine

Der hier genutzte Inhibitor Cl-amidine hemmt die Enzyme Peptidylarginin deiminase 2, 3 und bevorzugt 4. Cl-amidine gehört zu den potentesten PAD 4-Inhibitoren¹⁰⁷. PAD 4 ist die einzige PAD, die in den Granula und im Zellkern vorkommt¹⁰⁸. Physiologischer Weise wird sie in Leukozyten exprimiert¹⁰⁹. Sie ist unter anderem zusammen mit der neutrophilen Elastase und Myeloperoxidase an den Umbauvorgängen des Chromatins von neutrophilen Granulozyten in Vorbereitung zur NETosis beteiligt. Zur Formierung von NETs ist eine *deimination* oder *citrullination* von Histonen (H2A, H3, H4) des Chromatins notwendig. Dies bedeutet, dass die Aminosäure Arginin in Citrullin umgewandelt wird. Es konnte gezeigt werden, dass PAD 4 diese Umwandlung bedingt und essentiell für die Entstehung von NETs ist. Denn PAD 4-*knockout*-Mäuse zeigten keine Ausbildung von NETs^{110,111}. Der Inhibitor (Cl-amidine, Calbiochem[®]) wurde der Maus 30 Minuten prä OP intravenös über einen Schwanzvenenkatheter gegeben. Die gleiche Menge der Lösungssubstanz (PBS) diene als Kontrolle. Dazu konnten Knight et al. in einem murinen Modell mit NZM-Mäusen zeigen, dass die Gabe des PAD 4 Hemmers zu einer signifikant niedrigeren NETs-Ausbildung als in den Kontrollgruppen führte⁹⁶. Die irreversible Hemmung der PAD 4 durch Cl-amidine konnte *in vitro*- und *in vivo*-Versuchen belegt werden¹¹².

3.2.2. Dihydrodichlorofluoreszein

DCF (2,7 Dihydrodichlorofluoreszein) ist ein Fluoreszein, welches zur Gruppe der Xanthenfarbstoffe gehört¹⁰⁶. Es wird als DCF-Diacetat, welches eine zusätzliche Estergruppe besitzt, verwendet, da es so effektiver in der Zelle geladen werden kann. Zudem ist es so Zellmembran permeabler und kann somit leichter in intakte und lebende Zellen eintreten. Im Zytoplasma wird die Estergruppe durch zelluläre Esterasen abgespalten und der Rest des Moleküls wird oxidiert¹¹³. DCF wird mit einer Wellenlänge von 500 nm aktiviert und gibt ein Licht mit der Wellenlänge 525 nm wieder als Emission ab¹¹³.

DCF wird in der Intravitalmikroskopie als Fluorchrom verwendet, um Thrombozyten sichtbar zu machen. Diese wurden zuvor isoliert und den Tieren intravenös injiziert. Nach Aesch et al. wird der Effekt des Leuchtens durch DCF dadurch erzielt, dass DCF Licht aussendet, wenn es mit Licht einer definierten Wellenlänge bestrahlt wird¹⁰⁶. Fluorochrome, wie DCF besitzen Elektronen, die durch gesendetes Licht bestimmter Wellenlänge, in einen angeregten Zustand gehoben werden können. Bevor sie wieder in ihren Ursprungszustand zurückgehen, verlieren sie Energie, die als längerwelligeres Licht abgegeben wird. Die Farbe, des abgegebenen Lichtes ist dabei immer zu längerwelligerem Licht hin verschoben¹⁰⁶. Näheres siehe im Kapitel: „Prinzip der IVM“.

3.3. Isolierung und Applizierung von Thrombozyten

Die Isolierung und Applizierung von gefärbten Thrombozyten wurde für die Darstellung der Thrombusentstehung *in vivo* mittels der Intravitalmikroskopie durchgeführt. Damit war es möglich einen genauen Überblick über den zeitlichen Verlauf der Thrombusentstehung zu bekommen. Dazu wurde Blut einer Spendermaus gewonnen. Dieses wurde intrakardial mittels einer mit 170µl Citrat (Monovette®, Sarstedt) gefüllten Spritze abgenommen. Aus dieser Blutprobe wurden dann die Plättchen isoliert und mit DCF angefärbt. Die Spendermaus wurde zur Durchführung der Blutabnahme narkotisiert und im Anschluss durch die zervikale Dislokation getötet.

Die Plättchen wurden nach Massberg et al. isoliert¹¹⁴. Dazu wurde das Citrat-Blutgemisch zuerst vorsichtig in ein FACS-Röhrchen gefüllt und dann mit einem Tyrodes-Puffer (pH-Wert 6,5), bestehend aus Tyrodes, destilliertem Wasser, 10mM Hepes, Bovines Serumalbumin (BSA, Albumin Fraktion V, Roth®) und Glukose (Dextrose-monohydrate, Sigma-Aldrich®, Taufkirchen) auf eine Konzentration von 1:1 gebracht und bei 70 g für 20 Minuten zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5804). Nach dem ersten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand erneut mit Tyrodes-Puffer (pH-Wert 6,5) 1:1 gemischt und der Farbstoff DCF hinzugegeben. Dies wurde dann 3 Minuten im Dunkeln inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren bei 1250 g für 10 Minuten wurde der Überstand verworfen und das Pellet zu gleichen Anteilen zuerst mit 6,5 pH und anschließend mit 7,4 pH Tyrodes-Puffer resuspendiert und die Zellzahl in einem Blutanalysegerät (ABX Micros ES 60, HoribaABX) bestimmt, sodass eine einzelne Portion zur intravenösen Applikation eine Gesamtmenge von 150×10^3 /

Zellen bei einer Gesamtmenge von 250 µl enthielt.

Dies wurde den narkotisierten Tieren vor der OP über einen Schwanzvenenkatheter injiziert.

4. Histologie

4.1. Anfertigung von histologischen Schnitten

Die tiefgekühlten Thromben wurden mit einem Kryotom (Thermo Scientific™ CryoStar™ NX70) bei -20°C im Querschnitt geschnitten. Dafür wurden die Thromben mit einem Einbettmedium (Tissue-Tek®, Sakura, Alphen aan den Rijn, NL) aufrecht auf einen Stempel gesetzt. Das Einfriermedium stabilisiert das Gewebe und zeitgleich ist es dadurch möglich eine größere Schnittfläche zu erreichen.

Aus diesen Blöcken wurden dann jeweils 5 µm dicke Schnitte angefertigt. Pro Thrombus sind insgesamt 30 Querschnitte angefertigt worden. Der Rest des Thrombus wurde im Anschluss wieder konserviert und aufbewahrt. Die murinen Thromben befanden sich im Gegensatz zu den humanen Thromben noch im Gefäß. Daher musste die entsprechende Arterie erst bis zum Beginn des Thrombus angeschnitten werden. Ab dem Beginn des Thrombus wurden dann 30 Schnitte angefertigt. Jeweils 2 Schnitte wurden zusammen auf einen Objektträger (Menzel Gläser Superfrost® Plus, 25 x 75 x 1,0 mm, Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig) aufgetragen.

Anschließend wurden die Objektträger bis zum nächsten Verarbeitungsschritt bei -20° C gekühlt.

4.2. Immunfluoreszenzfärbung

Die Schnittfläche der rekrutierten humanen und generierten murinen Thromben, wurde auf die Qualität und Quantität von bestimmten Blutzellkomponenten hin untersucht. Dies wurde mittels der Immunfluoreszenz durchgeführt. Das Prinzip der Immunfluoreszenz beruht darauf bestimmte Epitope (z.B. Oligosaccharidkette, Aminosäuregruppe), die spezifisch für bestimmte Zellgruppen sind, durch die entsprechende Affinität von Antikörpern nachweisen zu können¹¹⁵. Für die Auswertung dieser Arbeit wurde die indirekte Nachweismethode durchgeführt.

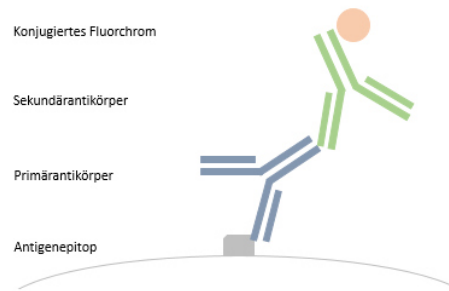


Abbildung 4: Indirekte Nachweismethode

Es wurden monoklonale Primärantikörper und polyklonale Sekundärantikörper genutzt.

Die verschiedenen Antikörper, die verwendet wurden sind in den Tabellen im Kapitel: „Antikörper“ aufgelistet.

1.1.1. Präparatvorbereitungen

Im ersten Vorbereitungsschritt wurden die Querschnitte der Thromben, auf den zu färbenden Objektträgern, großflächig mit einem Fettstift (ImmEdge™ pen, Vector) umrandet. Alle Prozessschritte des Färbens fanden bei Raumtemperatur statt. Der Fettstift gewährleistete, dass auf die Schnitte aufgetragene Flüssigkeiten nicht ablaufen konnten. Danach wurden die Schnitte mit einer 4%igen Formaldehydlösung für 3 Minuten fixiert. Durch die Ausbildung von Aldehydgruppen wird die Autolyse des Gewebes gestoppt. Dies war für die Qualität des Färbeergebnisses von großer Bedeutung, da die sonst bei Raumtemperatur einsetzende Autolyse und einhergehende Denaturierung von Proteinen unterbunden wurde.

Nach der Fixierung wurden die Schnitte mit einer Pufferlösung gewaschen. Bei dieser handelt es sich um die phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS - Phosphate buffered saline, GIBCO®) mit 0,1%igem Tween-Anteil (Tween 20®, Polysorbat-20, Sigma Aldrich). Tween ist ein Detergens, welches den Waschprozess unterstützt und es somit ermöglicht, dass die Formaldehydfixierung nach 3 Minuten aufgehoben wurde. Im weiteren Verlauf diente dieser Puffer dazu, ungebundene Antikörper von den Schnitten zu waschen, damit war nachfolgend eine spezifische Antikörperbindung gewährleistet¹¹⁶.

Bevor der jeweils erste Antikörper aufgetragen wurde, wurden ein Gemisch aus Bovinem Kälberserum Albumin (BSA, Albumin Fraktion V, Carl Roth®), Fc-

Antikörper (1:100, Purified Anti-mouse, Clone: 93, CD 16/32, ml at 0.5mg/ml blocks FC-binding, Bioscience) und PBS aufgetragen. Dies ermöglichte, dass der primäre Antikörper spezifisch binden konnte. Denn das fremde Serum besitzt keine spezifischen Antikörper gegen das gesuchte Antigen und hat somit an unterschiedlichen Ladungen des Gewebes gebunden¹¹⁶. Der Fc-Antikörper bindet an Fc-Rezeptoren auf der Zelloberfläche und verhindert somit, dass der Fc-Teil des Primärantikörpers an diese Rezeptoren binden kann und dadurch sämtliche unspezifische Bindungsmöglichkeiten für den Primärantikörper besetzt. Das Gemisch wurde für 30 Minuten ohne anschließende Waschung auf den Schnitten belassen. Anschließend wurden dann je nachdem welche Zellen sichtbar gemacht werden sollten, die spezifischen Primärantikörper mit einer Inkubationszeit von jeweils 60 Minuten direkt auf das Block-Gemisch aufgetragen. Nach dieser Zeit wurden die Schnitten drei Mal mit der zuvor verwendeten gepufferten Kochsalzlösung und 1%igem Detergens gewaschen. Die zweiten Antikörper hatten ebenfalls eine Inkubationszeit von 60 Minuten. Alle Antikörper wurden in 1%igem PBS verdünnt und es wurde jeweils eine Menge von 100µl auf jeden Schnitt aufgetragen. Zudem wurden die Schnitte während des gesamten Färbeprozesses in einer von Licht geschützten Färbekammer (Stain TrayTM, Carl Roth[®]) aufbewahrt.

.

1.1.2. Verwendete Antikörper

In den folgenden Tabellen sind die verwendeten primären und sekundären Antikörper aufgelistet.

Tabelle 1: Murine Antikörper

Antigen	1. AK	Klon	Hersteller	2. AK	Hersteller
CD 41	Ratte	MWReg30	BD	Donkey-anti rat Alexa Fluor 594	Invitrogen
CD 45	Ratte	30-F11	eBioscience	Donkey-anti rat Alexa Fluor 488	Invitrogen
Fibrinogen	Kaninchen	A0080	DAKO	Goat anti-rabbit Alexa Fluor 594	Invitrogen
NE	Kaninchen	ab68672	Abcam	Goat anti-rabbit Alexa Fluor 594	Invitrogen

Tabelle 2: Humane Antikörper

Antigen	1. AK	Klon	Hersteller	2. AK	Hersteller
CD 41	Maus	P2	Beckman	Goat anti-mouse Alexa Fluor 594	Invitrogen
NE	Kaninchen	ab68672	Abcam	Goat anti-rabbit Alexa Fluor 594	Invitrogen
Fibrinogen	Kaninchen	A0080	DAKO	Donkey anti- rabbit Alexa Fluor 594	Invitrogen
CD 45	Maus	2B11+PD7/26	DAKO	Goat anti-mouse Alexa Fluor 488	Invitrogen
FXII	Maus	ab1007	Abcam	Donkey anti- mouse Alexa Fluor 488	Invitrogen

1.1.3. Präparatnachbereitungen

Nach der Inkubationszeit der jeweiligen sekundären Antikörper wurde direkt eine Verdünnung eines DNA-Fluoreszenz-Farbstoffes (Hoechst 33342, 10mg/ml solution in water, Invitrogen TM Molecular Probes™ 10 ml) aufgetragen, um einen Kontrastfarbstoff zum Chromogen zu schaffen und um somit die Morphologie des Schnittes besser darstellen zu können¹¹⁵. Im Anschluss wurde dann letztmalig wie bisher gewaschen. Nach der Waschung mussten die Objektträger feucht gehalten und zügig eingedeckelt werden. Dazu wurde ein Tropfen eines Eindeckmediums für Fluoreszenzfärbungen (Fluorescence Mounting Medium, Dako) auf den Objektträger gegeben und dann ein

Deckgläschen ohne Luftblaseneinschluss auf die Thrombusschnittfläche gegeben. Die gefärbten Schnitte wurden anschließend bis zum Photographieren bei 6°C lichtgeschützt gekühlt. Um eine optimale Bildqualität und Färbstoffintensität zu gewährleisten, wurden die gefärbten Schnitte innerhalb von 48 Stunden photographiert.

1.1.4. Färbekontrollen

Um die gefärbten Ergebnisse korrekt interpretieren zu können, wurden jeweils geeignete Positiv- und Negativkontrollen durchgeführt. Diese sollten zeigen inwieweit spezifisch der jeweils verwendete Antikörper war. Zudem konnten falsch negative und falsch positive Ergebnisse ausgeschlossen werden. Für diese Arbeit wurden zwei Negativkontrollen durchgeführt. Beide gaben Aufschluss über das Ausmaß an unspezifischen Reaktionen des primären Antikörpers. Diese Reaktionen können durch das unspezifische Binden des Primärantikörpers an Fc-Rezeptoren oder an spezifisch geladene Zelloberflächenproteine der nachzuweisenden Zellen verursacht werden. Um dies zu vermeiden sind, wie in den Präparationsvorbereitungen beschrieben, bestimmte Vorkehrungen getroffen worden.

Die erste Negativkontrolle gibt Aufschluss darüber, ob der sekundäre Antikörper unspezifisch bindet. Die zweite Negativkontrolle mit dem Isotypen des verwendeten Primärantikörpers gibt Aufschluss über das falsch positive Hintergrundsignal der jeweiligen Färbung.

Tabelle 3: Färbekontrollen

Kontrolle	Präparat	Primärantikörper	Sekundärantikörper
Positiv	Fremdes Gewebe, welches das gesuchte Antigen enthält	Der gleiche wie im Versuch	Der gleiche wie im Versuch
Negativ	Schnittpräparat der zu untersuchenden Probe	PBS	Der gleiche wie im Versuch
Isotyp	Schnittpräparat der zu untersuchenden Probe	Isotyp des entsprechenden Primärantikörpers	Der gleiche wie im Versuch

1.2. Auswertung

1.2.1. Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen

Die Thrombusschnitte wurden im Anschluss an das immunhistologische Färben unter dem Fluoreszenzmikroskop (Leica DMRB, Bensheim) durch eine Digitalkamera (AxioCam, Zeiss, Göttingen) und eine entsprechenden Software (AxioVision) photographiert.

Dazu wurde von jedem Objektträger eine Übersichtsaufnahme mit entweder 5x oder 10x Vergrößerung angefertigt. Von der Thrombusgesamtfläche sind dann jeweils vier Bereiche ausgewählt worden, die dann in 40x Vergrößerung photographiert wurden. Diese Bereiche sind manuell ausgewählt worden, wobei darauf geachtet worden ist, dass sie gleichmäßig über die Gesamtfläche verteilt waren. Entscheidend bei der Auswahl der 40x Vergrößerungsaufnahmen war, dass die gesamte Bildfläche durch Thrombusmasse bedeckt sein musste. Dies war entscheidend für die späteren prozentualen Ergebnisse. Denn die Leukozyten und neutrophilen Granulozyten wurden manuell ausgezählt und dann prozentual auf die Thrombusgesamtfläche hochgerechnet. Der Anteil an Thrombozyten, wurde qualitativ durch ein positives Färbeergebnis (CD 41-Färbung) bestätigt. Für die Ermittlung des Thrombozyten- und Fibrinogenanteils, wurden die Farbbilder mit Hilfe der Bildanalyse-Software Image J in ein schwarz-weiß-Bild konvertiert und durch ein weiteres Bildanalyseprogramm (CapImage) quantitativ ausgewertet. Damit konnte der Thrombozyten- und Fibrinogenanteil pro Thrombusfläche in mm^2 ermittelt werden.

1.2.2. Statistische Auswertung

Die Daten der gewonnen Ergebnisse wurden statistisch mit SigmaPlot 12.0 (Systat Software, Inc, Chicago, USA) graphisch dargestellt und mit Adobe Illustrator CS6 (Adobe Systems Incorporated, San Jose, USA) angepasst. Zur Ermittlung der Signifikanz zwischen zwei zu vergleichenden Gruppen, führte SigmaPlot zuerst zwei Tests durch. Zum einen den Test auf Normalverteilung nach Shapiro-Wilk und den Test zur Prüfung der Varianzgleichheit (Equal Variance Test). Wenn die Tests ergaben, dass keine signifikante Abweichung von einer Normalverteilung und einer Varianzhomogenität bestand führte das Programm den t-Test zur Signifikanzermittlung durch. Lagen diese Voraussetzung für den t-Test nicht vor, führte das Programm einen Alternativtest,

den Rangsummentest nach Mann-Whitney durch.

Im Fall der Abbildung 16 wurde, um die Stärke des Zusammenhangs zwischen den beiden Variablen durch ein Korrelationsmaß zu quantifizieren, der Rangkorrelationskoeffizient nach Kendall Tau ermittelt.

In den Graphen sind die Mittelwerte durch entsprechende Querbalken dargestellt und werden zusammen mit dem SD (Standard deviation) und der Effektgröße angegeben¹¹⁷. Ausnahme stellt Tabelle 4 dar, in der die Mittelwerte zusammen mit dem SEM (Standard error of the mean) angegeben sind.

IV. ERGEBNISSE

1. Thrombozyten und Leukozyten spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung der arteriellen Thrombose in der Maus

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene *in vivo*-Mausmodelle zur Generierung arterieller Thromben in der A. carotis verwendet. Im ersten Modell, dem Eisen-III-Chlorid-Modell, wurde Thrombuswachstum in der A. carotis durch die extravasale Applikation von Eisen-III-Chlorid induziert. Im zweiten Modell wurde die Entstehung des arteriellen Thrombus durch die mechanische Endothelverletzung mit Hilfe eines Drahts ausgelöst.

In beiden *in vivo*-Modellen wurden Thromben nach 1, 3 und 6 Stunden nach Endothelverletzung entnommen. Die unterschiedlichen Zeitpunkte wurden ausgewählt, um frühe Thrombusentstehung mit einem späteren Zeitpunkt der Entwicklung innerhalb der Modelle und im direkten Bezug zu den humanen koronaren Thromben vergleichen zu können.

Die Thromben, des Eisen-III-Chlorid-Modells, wiesen eine kompakte, gleichmäßige Struktur auf und füllten in der Regel das gesamte Gefäßlumen aus. Im Gegensatz dazu waren die Thromben, des Drahtdenudationsmodells, deutlich weniger kompakt und insgesamt kleiner, ohne den kompletten Gefäßdurchmesser auszufüllen (Abbildung 5).

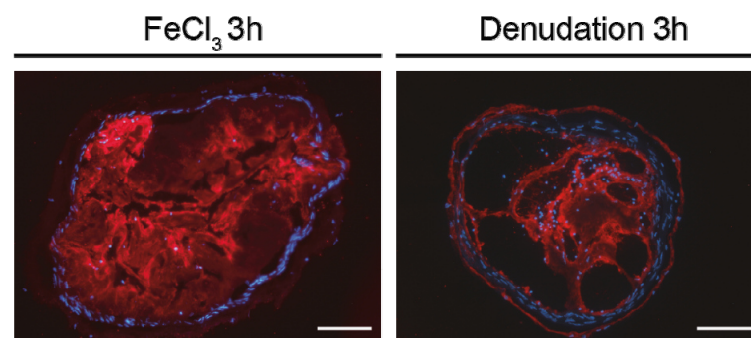


Abbildung 5: Immunfluoreszenzdarstellung der Thrombozytenfläche

Die Querschnitte der murinen Gefäße enthalten morphologisch deutlich unterschiedliche Thromben. Sie sind mit einem CD41-Antikörper (rot), positiv für Thrombozyten, angefärbt worden. Die Zellkerne wurden mit Hoechst® sichtbar gemacht (blau). Der Maßstabsbalken beträgt 100 µm.

Dies lässt vermuten, dass die Behandlung mit Eisen-III-Chlorid ein stärkerer Stimulus für die Thrombusentstehung ist, als die mechanische Endothelverletzung im Drahtdenudationsmodell.

Durch ihre kompaktere Thrombusmasse ähnelten die Thromben des Eisen-III-Chlorid-Modells im Gegensatz zum Drahtdenudationsmodell, makroskopisch mehr den in dieser Studie analysierten humanen koronaren Thromben, als die Thromben des Drahtdenudationsmodells.

Aufgrund dessen wurden die folgenden histologischen Analysen und der Vergleich zwischen murinen arteriellen Thromben und humanen koronaren Thromben anhand von Thromben des Eisen-III-Chlorid-Modells durchgeführt.

Es ist bekannt, dass Thrombozyten eine entscheidende Rolle bei der Entstehung arterieller Thromben spielen. Dementsprechend konnten CD41⁺ Thrombozyten in großer Anzahl in den 3 Stunden alten Thromben beider Mausmodelle nachgewiesen werden (Abbildung 5). Bei den Thromben des Eisen-III-Chlorid-Modells füllten Thrombozyten $80,5\% \pm 9,3\%$ der gesamten Thrombusfläche aus.

Neben Thrombozyten zeigte sich in den murinen Thromben eine große Anzahl an CD 45⁺ Leukozyten. Die Immunzellen waren im Thrombus in Zellgruppen oder Reihen angeordnet. Dies stellte einen deutlichen Unterschied zu den diffus über die gesamte Thrombusfläche verteilten Thrombozyten dar. Zur weiteren Differenzierung der Leukozyten, wurde gezielt auf neutrophile Granulozyten durch die immunfluoreszierende Färbung auf neutrophile Elastase untersucht. (siehe Abbildung 6).

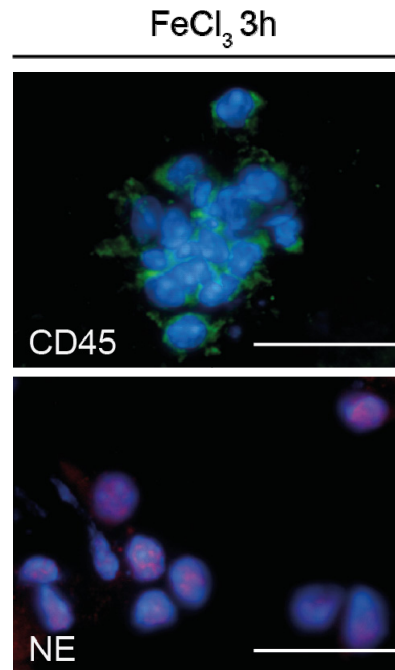


Abbildung 6: Darstellung von neutrophilen Granulozyten in murinen Thromben

Das obere Bild zeigt die Darstellung der murinen Leukozyten durch einen CD45-Antikörper (grün), das untere Bild zeigt die Darstellung der neutrophilen Granulozyten durch die Anfärbung der neutrophilen Elastase (rot). Zellkerne sind mit Hoechst® (blau) angefärbt. Der Maßstabsbalken beträgt 10 μm .

Im Anschluss an die qualitative Darstellung der Leukozyten, wurden diese quantifiziert. Dabei lag der Anteil der neutrophilen Granulozyten an der Gesamtzahl der Leukozyten bei $81,1 \pm 19,1 \%$ (Abbildung 7).

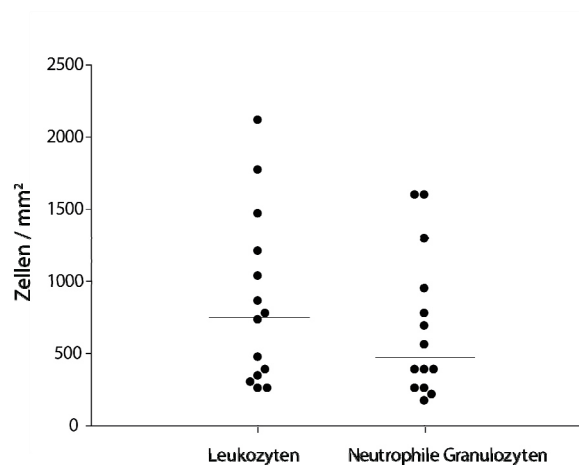


Abbildung 7: Quantifizierung von Leukozyten und neutrophilen Granulozyten

Die hier untersuchte murine Gruppengröße beträgt $n=14$. Der Median ist jeweils durch einen Querbalken dargestellt.

Um mehr über die Rekrutierung von Leukozyten zu erfahren, wurden murine

Thromben des Eisen-III-Chlorid-Modells 1, 3 und 6 Stunden nach der Induktion des Thrombuswachstums auf Leukozyten untersucht. Die jüngsten Thromben, mit einem Alter von einer Stunde, wiesen auch die geringste Anzahl an Leukozyten auf. Mit steigendem Thrombusalter nahm entsprechend die Leukozytenzahl im Thrombus zu. Die Anzahl der quantifizierten Leukozyten war um das 4-fache höher in den sechs Stunden alten Thromben, als in den Thromben eine Stunde nach Induktion der arteriellen Thrombose (siehe Abbildung 8).

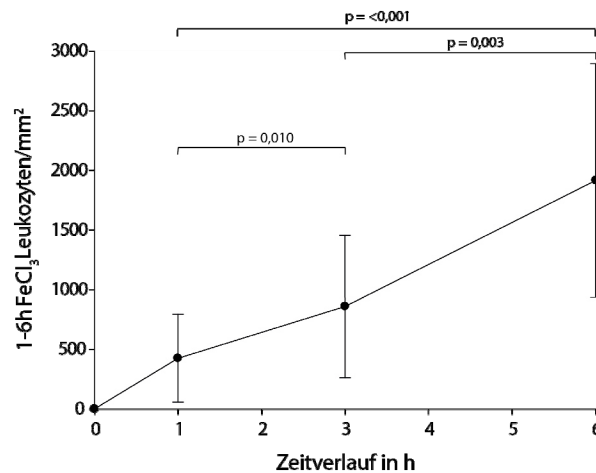


Abbildung 8: Zusammenhang zwischen der Anzahl der Leukozyten und dem Thrombusalter in Thromben aus dem Eisen-III-Chlorid-Modell

Die hier dargestellten Gruppengrößen betragen $n=16$ (1h), $n=14$ (3h) und $n=10$ (6h). Mittelwert \pm SD. Die Effektgröße beträgt: 1h-3h: 0,92; 3h-6h: 1,43 und 1h-6h: 2,35.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass diese Untersuchungen zeigen, dass Thrombozyten, und neutrophile Granulozyten, als größte Untergruppe der Leukozyten im Thrombus, die wichtigsten Zellgruppen in der arteriellen Thrombose *in vivo* darstellen.

2. Vergleichbare Mechanismen der arteriellen Thrombose bei Maus und Mensch

Nach Auswertung der murinen Thromben, folgte der Vergleich des Eisen-III-Chlorid-Modells mit den humanen koronaren Thromben. Die humanen Thromben stammten von Patienten, die sich aufgrund eines thrombotischen Verschlusses einer Koronararterie einer notfallmäßigen Herzkatheteruntersuchung unterziehen mussten. Während der Herzkatheteruntersuchung konnte die betroffene Koronararterie durch Absaugen des thrombotischen Materials wieder reperfundiert werden. Diese Untersuchungen fanden zum einen im Klinikum rechts der Isar und zum anderen im Deutschen Herzzentrum in München statt.

Alle humanen Thromben wurden für die histologische Aufarbeitung, wie im Material und Methodenteil beschrieben, in flüssigem Stickstoff konserviert und anschließend für die Immunfluoreszenzfärbung vorbereitet.

Insgesamt wurden 137 Thromben von 137 Patienten gesammelt. Von diesen 137 Patienten erteilten 25 nicht die schriftliche Genehmigung zur histologischen Aufarbeitung des thrombotischen Materials und wurden deshalb aus der Studie ausgeschlossen. Von den verbliebenen 112 Thromben konnten 14 nicht analysiert werden, da das Thrombusmaterial zu klein war. Letztendlich standen 98 humane Thromben aus Koronararterien für die histologische Aufarbeitung zur Verfügung (siehe Abbildung 9).

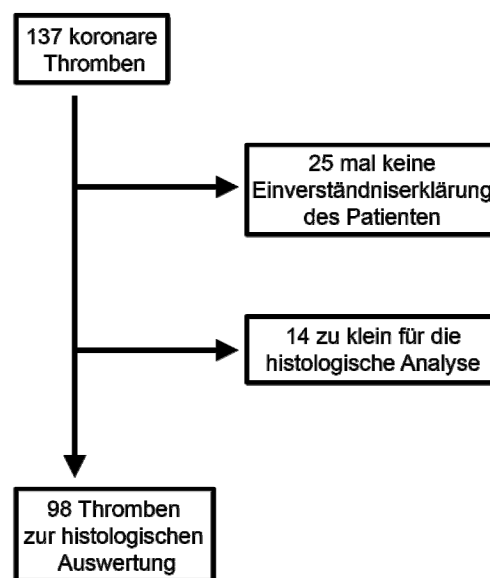


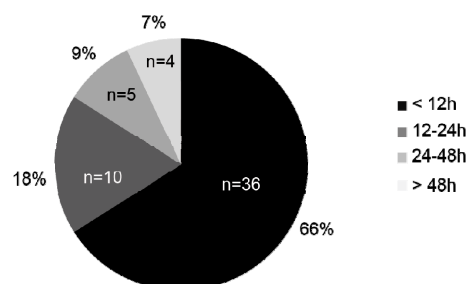
Abbildung 9: Übersicht der gesammelten humanen Thromben

Tabelle 4 zeigt die Baselinecharakteristika der 98 Patienten. Die Patienten waren im Durchschnitt $63,6 \pm \text{SEM } 10,9$ Jahre alt. Der Großteil der Patienten waren Männer mit einer koronaren 1- oder 3-Gefäßerkrankung (36,45) und einer reduzierten linksventrikulären Ejektionsfraktion ($\text{EF} = 46 \pm \text{SEM } 10\%$). Über die Hälfte der Patienten (61,6%) wurde mit einem ST-Hebungsinfarkt stationär aufgenommen. Zu den häufigsten kardiovaskulären Risikofaktoren der Patienten zählte zum einen die Hypercholesterinämie (61,6%), und zum anderen die arterielle Hypertonie (66,7%). Nur 8% der Patienten nahmen zum Zeitpunkt der Thrombusaspiration eine duale antithrombotische Therapie ein.

Tabelle 4: Baselinecharakteristika

Charakteristika	
Alter (n=98)	
Durchschnitt ---- Jahre	63.6 +/- 10.9
Männlich ----- nr (%) (n=98)	76 (76.8%)
Koronare Arterienerkrankungen (n=97)	
1 Gefäß	36 (36.4%)
2 Gefäß	24 (24.2%)
3 Gefäß	36 (36.4%)
linksventrikuläre Ejektionsfraktion --- %	(n=84) 46 +/- 10
PCI in der Vorgeschichte	(n=95) 18 (18.2%)
Gefäß, aus dem Thrombus stammt (n=98)	
ACVB	6 (6.1%)
LAD	30 (30.3%)
LCx	10 (10.1%)
RCA	52 (52.5%)
Kardiovaskuläre Risikofaktoren --- (n=95)	
Diabetes mellitus	21 (21.2%)
familiäre Disposition	37 (37.4%)
Hypercholesterinämie	61 (61.6%)
arterielle Hypertonie	66 (66.7%)
Ex-/Raucher	40 (40.4%)
Weitere Erkrankungen ----- nr. (%) (n=95)	
Nierenversagen	8 (8.1%)
Patienten stationär aufgenommen mit (n=95)	
instabile Angina pectoris	6 (6.1%)
NSTEMI	24 (24.2%)
STEMI	61 (61.6%)
Patienten mit (n=80)	
Aspirin	23 (23.2%)
ADP-Rezeptor Antagonist	11 (11.1%)
Laborparameter (n=98)	
CRP mg/l	20 (+/- 45)
Leukozyten 10 ⁹ /l	11.4 (+/- 4.5)
Thrombozyten 10 ⁹ /l	225 (+/- 67)
CKmax U/l	2556 (+/- 3088)
CK-MBmax U/l	285 (+/- 330)
Troponin T max ng/ml	6.48 (+/- 12.4)
Multiplate ADPTest (U)	720 (+/- 458)

Bei 55 Patienten war es möglich den genauen Zeitpunkt des Symptombeginns aus der Anamnese zu ermitteln. Dies erlaubte eine Abschätzung des Thrombusalters als Zeitraum zwischen Symptombeginn und Durchführung der Herzkatheteruntersuchung. 66% der 55 Patienten erreichten das Krankenhaus innerhalb der ersten 12 Stunden nach Eintritt der ersten Symptome. 18% der Patienten kamen zwischen 12 und 24 Stunden nach Symptombeginn und 16% der Patienten wurden erst nach 24 Stunden ins Krankenhaus eingeliefert (siehe Abbildung 10).

**Abbildung 10: Aufteilung der Thromben nach Alter (n=55)**

Die Auswertung der humanen Thromben wurde nach demselben Prinzip durchgeführt, wie die Auswertung der murinen Thromben. Durch die HE-Färbung wurde deutlich, dass die Struktur der humanen Thromben sehr kompakt ist und am ehesten den Thromben aus dem Eisen-III-Chlorid-Modell ähnelt. Leukozyten waren ähnlich wie bei den murinen Thromben inhomogen in kleinen Gruppen oder Reihen über die gesamte Thrombusfläche verteilt (siehe Abbildung 11).

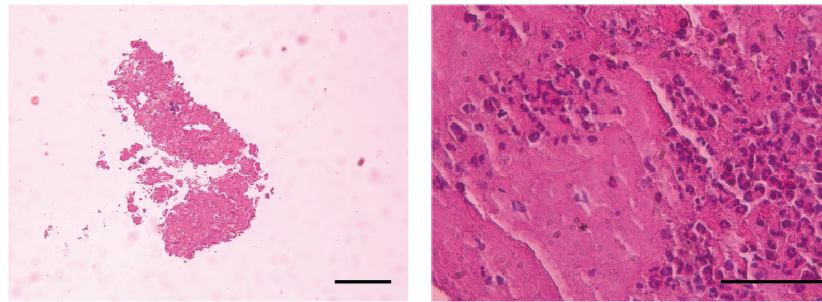


Abbildung 11: Beispielbilder eines humanen Thrombus in Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Der Maßstabsbalken des linken Bildes beträgt 200 µm und der des rechten Bildes 50 µm.

Ähnlich wie bei den bereits beschriebenen murinen Thromben des *in vivo* Mausmodells, konnten CD 41+ Thrombozyten in großer Zahl auch in den humanen Thromben nachgewiesen werden (siehe Abbildung 12).

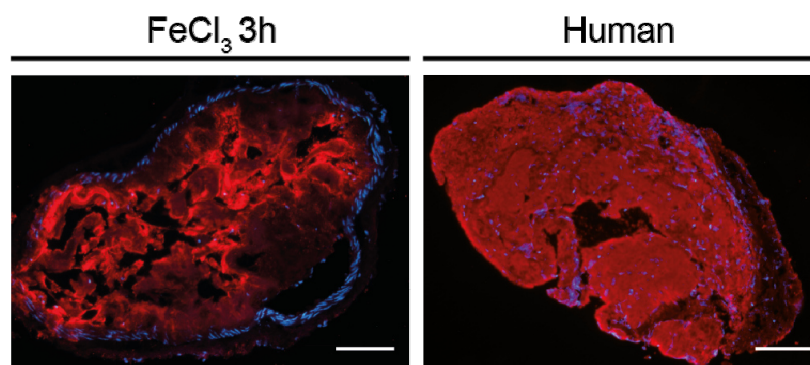


Abbildung 12: Vergleich der Thrombozytenfläche zwischen Maus und Mensch

CD 41+ Thrombozyten stellen sich rot dar und die Zellkerne sind mit Hoechst® angefärbt (blau). Der Maßstabsbalken beträgt 100 µm.

Thrombozyten, als Hauptbestandteil arterieller Thromben, nahmen bei den humanen Thromben $57,7 \pm 16,9\%$ der Thrombusfläche ein. Es bestand diesbezüglich kein signifikanter Unterschied zwischen den humanen und den murinen Eisen-III-Chlorid-Thromben. Dies unterstreicht die Annahme der guten Vergleichbarkeit zwischen Eisen-III-Chlorid- und den für diese Studie

rekrutierten humanen Thromben (siehe Abbildung 13).

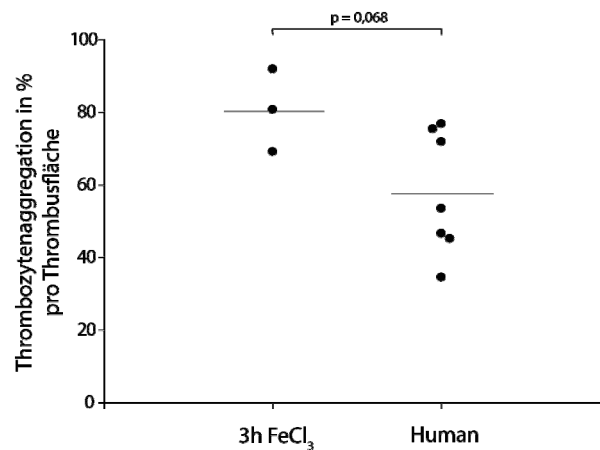


Abbildung 13: Vergleich der Thrombozytenaggregationsfläche von murinen Eisen-III-Chlorid- und humanen Thromben

Die Gruppengröße beträgt n=3/ murine Eisen-III-Chlorid-Gruppe und n=7/ humane Gruppe. Die Mittelwerte sind durch Querbalken dargestellt. Die Effektgröße beträgt: 1,6

Ähnlich wie bei den murinen Thromben gelang es in humanen Thromben Thrombozyten und Leukozyten, wie z. B. neutrophile Granulozyten, in großer Zahl nachzuweisen (siehe Abbildung 14). Dies spricht für eine wichtige Rolle der Immunzellen bei der Entstehung der arteriellen Thrombose beim Menschen.

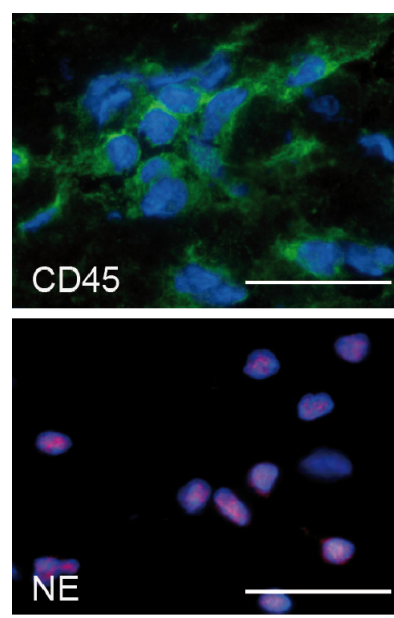


Abbildung 14: Nachweis von Leukozyten in humanen Thromben

Der CD45-Antikörper stellt Leukozyten (grün) dar. Die neutrophile Elastase (rot) stellt die neutrophilen Granulozyten dar. Die Zellkerne sind mit Hoechst® (blau) angefärbt worden. Der Maßstabsbalken beträgt 10 µm.

Auch in den humanen Thromben repräsentieren neutrophile Granulozyten mit $72,1\% \pm 26,3\%$ die größte Untergruppe der Leukozyten, ähnlich wie in den murinen Thromben (siehe Abbildung 15).

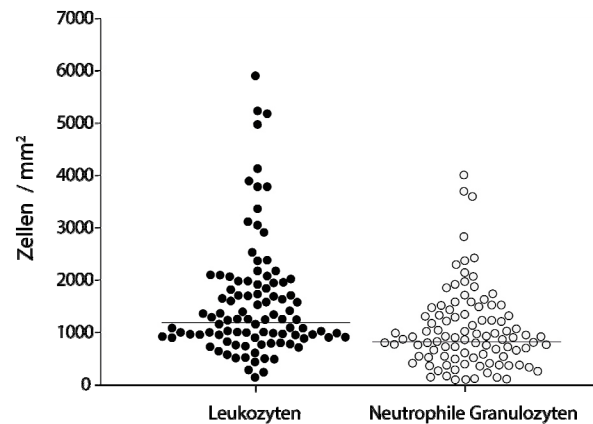


Abbildung 15: Leukozyten und Neutrophile pro mm² in humanen koronaren Thromben

Die Gruppengröße der humanen Thromben beträgt $n = 98$. Der jeweilige Median ist durch Querbalken dargestellt.

Aufgrund der Beobachtung im *in vivo* Maus-Modell, dass die Leukozytenzahl in den Thromben mit steigendem Thrombusalter zunahm, wurde als nächstes untersucht, ob ein ähnlicher Effekt bei den humanen Thromben vorliegt.

Innerhalb der ersten 12 Stunden nach Symptombeginn zeigt sich jedoch keine Tendenz, dass die Leukozyten in den humanen Thromben mit steigendem Thrombusalter zunehmen ($T = 0,221$ und $p = 0,727$, siehe Abbildung 16). Dies stellt einen Unterschied zu den Beobachtungen bei der Entstehung der arteriellen Thrombose im Mausmodell dar.

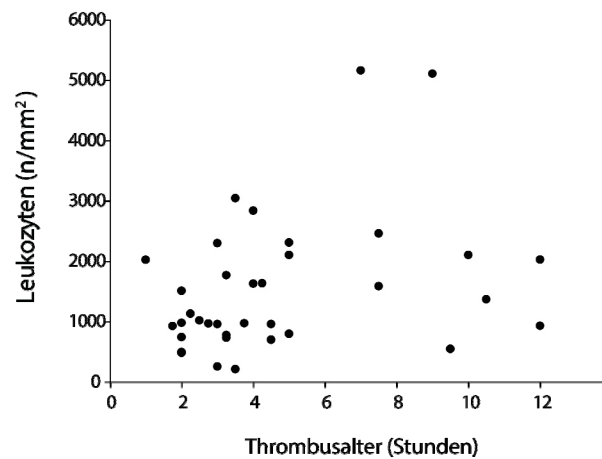


Abbildung 16: Zusammenhang zwischen Leukozytenzahl und Thrombusalter (n=36)

Der Korrelationskoeffizient beträgt: $r = 0,221$

Neben der qualitativen und quantitativen Analyse von Leukozyten und Thrombozyten wurden im Weiteren Faktoren des Gerinnungssystems untersucht. Zum einen wurde der Initiator des intrinsischen Weges der Gerinnungskaskade, Faktor FXII und zum anderen das Endprodukte der Gerinnungskaskade, Fibrin und sein Vorläufer Fibrinogen untersucht. Faktor XII konnte über die ganze Thrombusfläche verteilt durch entsprechende immunfluoreszierende Färbungen in humanen Thromben nachgewiesen werden (siehe Abbildung 17).

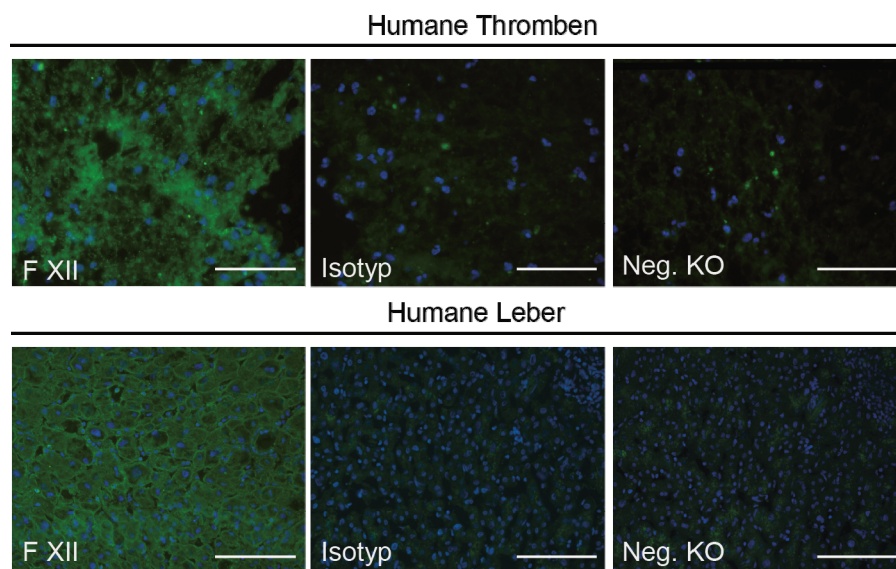


Abbildung 17: FXII Nachweis

Anfärbung erfolgte durch FXII Antikörper (grün) und durch Hoechst® (blau) für Zellkerne. Der Maßstabsbalken beträgt 50 µm.

Fibrinogen konnte sowohl in murinen, als auch in humanen Thromben in

vergleichbarem Maße detektiert werden (siehe Abbildung 18 und 19).

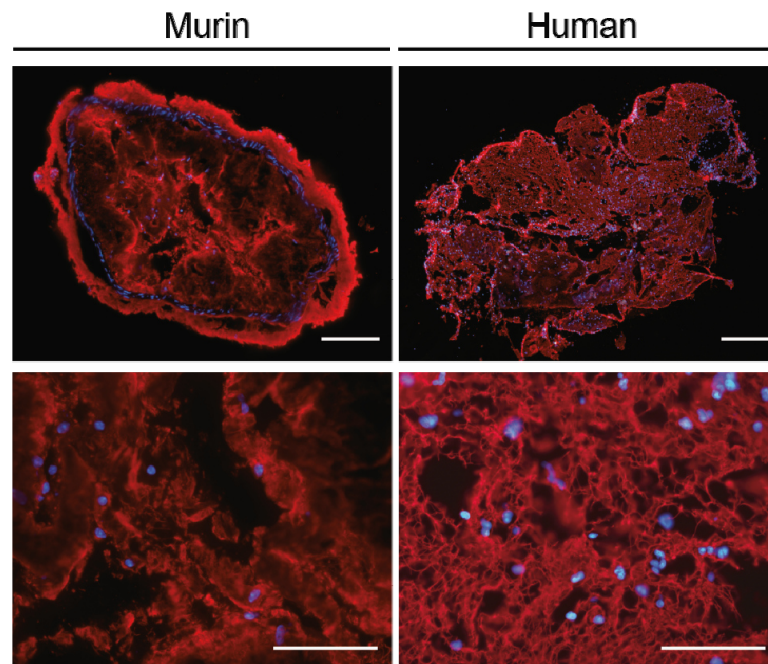


Abbildung 18: Fibrinogen/Fibrin-Nachweis

Die Übersichten haben einen Maßstabsbalken von 200 µm (links) und 300 µm (rechts). Der murine Thrombus ist durch Eisen-III-Chlorid-Behandlung entstanden. Der Maßstabsbalken der unteren Bilder beträgt 50 µm.

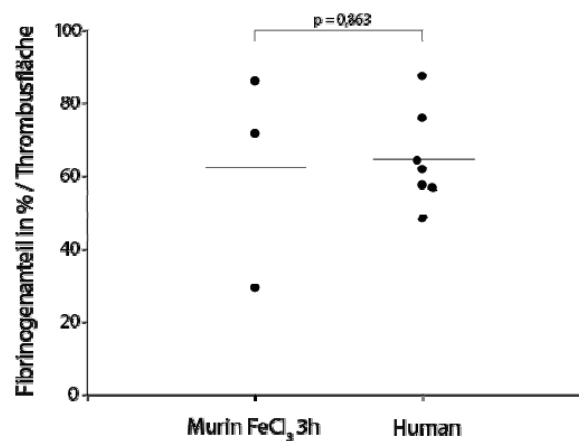


Abbildung 19: Vergleich des Fibrinogen/Fibrin-Anteils zwischen murinen Eisen-III-Chlorid (n=3) und humanen Thromben (n=7)

Die Mittelwerte sind als Querbalken eingefügt. Die Effektgröße beträgt: 0,14.

Bis jetzt konnten viele Übereinstimmungen zwischen murinen Eisen-III-Chlorid- und humanen koronaren Thromben festgestellt werden. Bei beiden Spezies konnten Thrombozyten in großer Menge nachgewiesen werden. Des Weiteren wiesen die Thromben eine vergleichbare Anzahl an neutrophilen Granulozyten auf. Auch bei der Betrachtung von bestimmten Faktoren des Gerinnungssystems,

wie z.B. Fibrinogen/Fibrin, konnten Gemeinsamkeiten aufgezeigt werden. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass wichtige Komponenten der Immunothrombose beim Menschen und bei der Maus ebenfalls eine entscheidende Rolle in der Thrombusentwicklung und -stabilisierung spielen.

3. NETs spielen eine entscheidende Rolle in der Entstehung und Stabilisierung arterieller Thromben in der Maus

Es wurde bereits in anderen Arbeiten gezeigt, dass neutrophile Granulozyten in Mäusen fähig sind Neutrophil Extrazellulär Traps (NETs) zu bilden. NETs bestehen aus DNA und Histonen, sind negativ geladen und stellen aufgrund ihrer prothrombotischen katalytischen Eigenschaften einen Dreh- und Angelpunkt in der Immunothrombose dar. Interessanter Weise konnten NETs in Thromben beider *in vivo*-Mausmodelle nachgewiesen werden (siehe Abbildung 20).

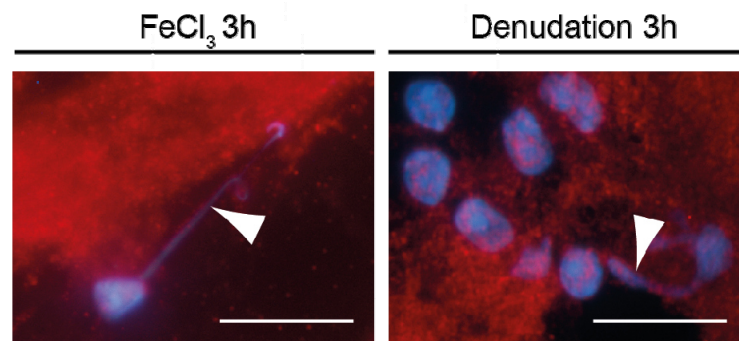


Abbildung 20: Murine Neutrophil Extracellular Traps

Immunfluoreszierende Färbung auf neutrophile Elastase. Die NETs sind durch weiße Pfeile markiert. Die Zellkerne sind mit Hoechst® angefärbt. Der Maßstabsbalken beträgt 10 µm.

Um die funktionelle Rolle von NETs näher zu untersuchen und belegen zu können, wurden *in vivo*-Versuche mit dem Intravitalmikroskop durchgeführt. Dazu wurde Mäusen, prä Eisen-III-Chlorid-OP, der Inhibitor Cl-amidine für das Enzym Peptidylarginin deiminase injiziert. Dieser Inhibitor hemmt bevorzugt die Kalzium gebundene Form der PAD 4 irreversibel. PAD 4 ist an den Umbauvorgängen des Chromatins zur NETs-Ausbildung beteiligt. Willis et al. konnten zeigen, dass diese Funktion durch Cl-amidine unterbunden wird¹¹⁸. Folglich können neutrophile Granulozyten unter dem Einfluss von Cl-amidine keine NETs ausbilden. Als Kontrollgruppe diente die gleiche Anzahl an Tiere, die mit PBS, dem Lösungsmittel der Cl-amidine, vorbehandelt wurden.

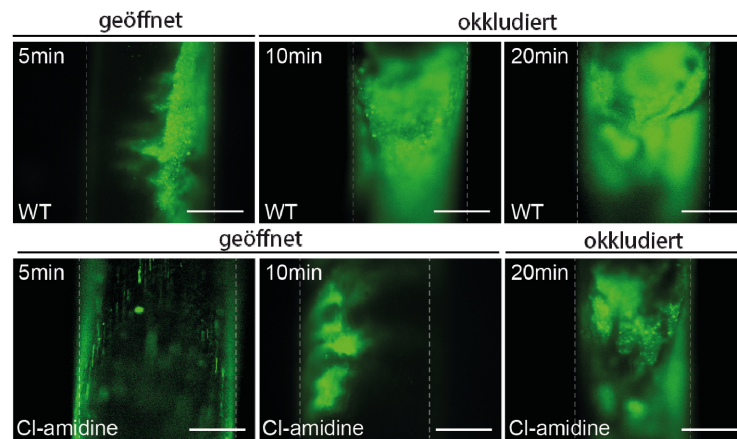


Abbildung 21: Intravitalmikroskopie nach Eisen-III-Chlorid-Behandlung und Cl-amidine-Gabe

In der Kontrollgruppe (WT) ist die A. carotis nach 10 Minuten nicht mehr durchgängig. In der mit Cl-amidine vorbehandelten Maus ist das Gefäß nach 5 und 10 Minuten noch durchgängig und erst nach 20 Minuten verschlossen. Die in grün sichtbaren Thrombozyten wurden vorab isoliert, mit DCF angefärbt, und vor der Operation injiziert. Der Maßstabsbalken beträgt 200 μm .

Der Verschluss der Arteriae carotides der Kontrollgruppe erfolgte durchschnittlich nach 11,8 Minuten ($\text{SD} \pm 2,8 \text{ Min}$). Die mit Cl-amidine behandelten Mäuse zeigten einen deutlich längeren Zeitverlauf bis zum Verschluss des Gefäßes. Hier trat der Gefäßverschluss durch einen Thrombus nach durchschnittlich 18 Minuten ($\text{SD} \pm 6,7 \text{ Min}$) ein. Dies zeigt deutlich den Effekt von NETs auf die Ausbildung von arteriellen Thromben (siehe Abbildung 22).

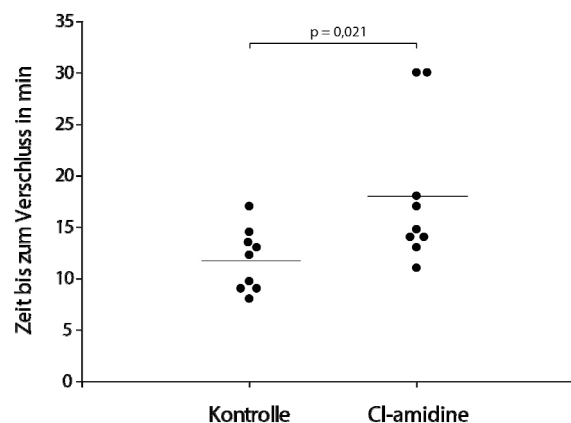


Abbildung 22: Zeit bis zum Verschluss

Die mit Cl-amidine behandelten Tiere ($n=9$) zeigen eine signifikant längere Zeit bis zum Verschluss als die Kontrollgruppe ($n=9$). Die Querbalken stellen die Mittelwerte dar. Die Effektgröße beträgt: 1,2.

Ein deutlicher und signifikanter Effekt zeigte sich bei der Dauer des Verschlusses. Durch die Hemmung der PAD 4 durch Cl-amidine lag die durchschnittliche Dauer des Verschlusses in dieser Gruppe bei 5,7 Minuten ($SD \pm 6,5$ Minuten). Der Wert der Kontrollgruppe lag durchschnittlich bei 18,5 Minuten ($SD \pm 13,3$ Minuten) (siehe Abbildung 23).

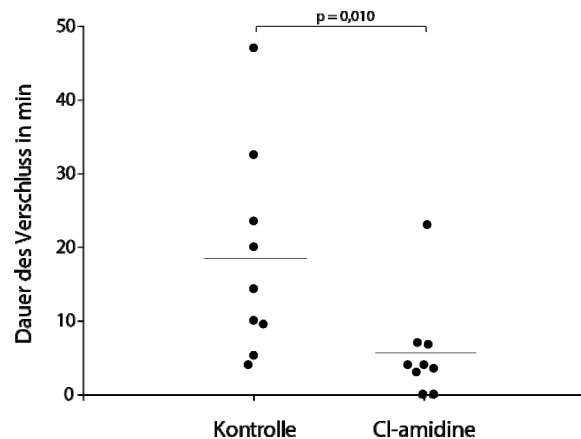


Abbildung 23: Dauer des Verschlusses

Die Dauer wurde als Differenz zwischen Verschlusseintritt und Wiedereröffnung des Gefäßes berechnet. Die Gruppengröße bestand aus jeweils $n=9$ Tieren. Die Effektgröße beträgt: 1,22.

So wurden im translationalen Versuchsansatz mit dem PAD-Inhibitor Cl-amidine die Ausbildung von NETs unterbunden. In der Versuchsgruppe mit dem PAD-Inhibitor Cl-amidine konnten signifikante Unterschiede zu der mit PBS behandelten Kontrollgruppe festgestellt werden. So konnte gezeigt werden, dass NETs eine prothrombotische Wirkung haben. NETs verbessern somit erheblich die Formierung und Stabilisierung von Thromben im Zuge der arteriellen Thrombose bei der Maus¹¹⁹.

4. Nachweis von NETs in humanen arteriellen Thromben

Aufgrund des oben beschriebenen Nachweises von neutrophilen Granulozyten in großer Zahl in humanen Thromben und aufgrund des Nachweises von NETs in murinen Thromben und deren funktioneller Rolle in der Entstehung und Stabilisierung arterieller Thromben im Eisen-III-Chlorid-Modell, wurden humane Thromben auf NETs untersucht. Tatsächlich konnten in 20% der humanen Thromben NETs in ähnlicher Formation nachgewiesen werden.

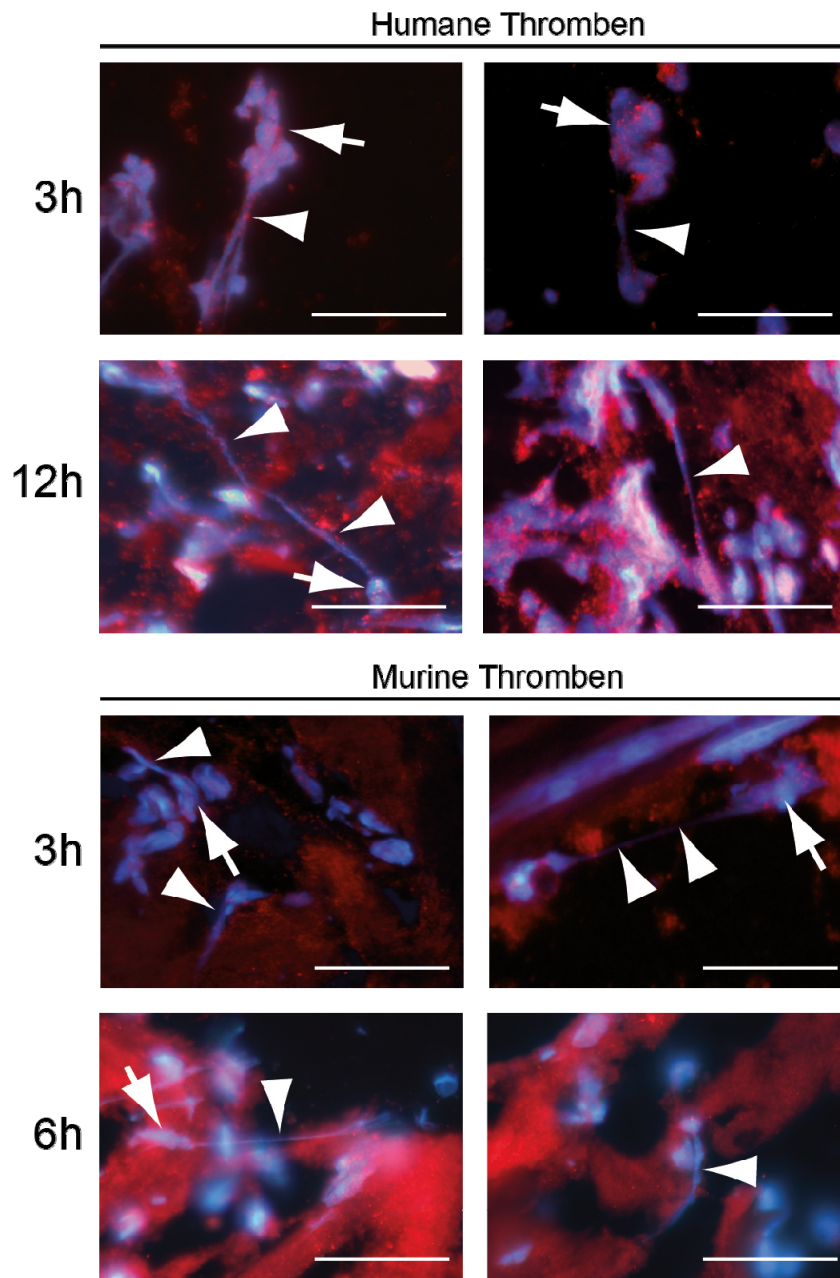


Abbildung 24: Neutrophil Extracellular Traps

Die Thrombusschnitte von Maus und Mensch wurden mit einem neutrophile Elastase spezifischen Antikörper angefärbt (rot). DNA wurde mit Hoechst® (blau) angefärbt. Die weißen Pfeile markieren in den jeweiligen Bildern die NETs. Der Maßstabsbalken beträgt 10 μm .

Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied in der Anzahl der NETs pro 100 Leukozyten in humanen und murinen Thromben (siehe Abbildung 25).

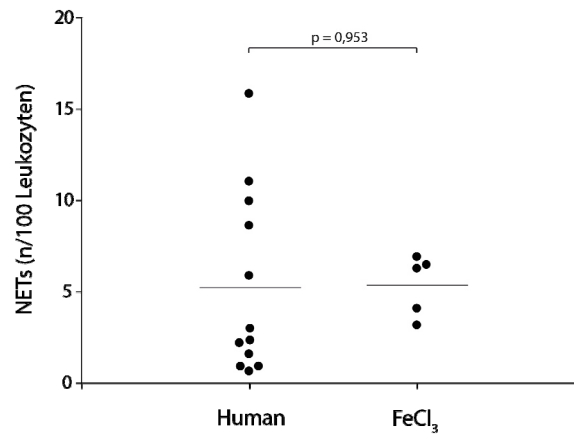


Abbildung 25: Quantifizierung der NETs von Mensch (n=12) und Maus (n=5)

Das Alter der humanen Thromben lag unter 12h und das Alter der murinen Thromben lag zwischen 3 und 6h. Die Mittelwerte sind durch Querbalken dargestellt. Die Effektgröße beträgt: 0,02.

Interessanter Weise zeigte sich bezüglich der NETs eine ähnliche Kinetik in murinen und humanen Thromben, wie bereits schon bei den Leukozyten. Ältere Thromben wiesen auch eine höhere Anzahl an NETs auf, als jüngere Thromben. So ist die Anzahl der NETs in den 6-12 Stunden alten Thromben 3fach so groß wie bei den 2-5h alten Thromben (siehe Abbildung 26).

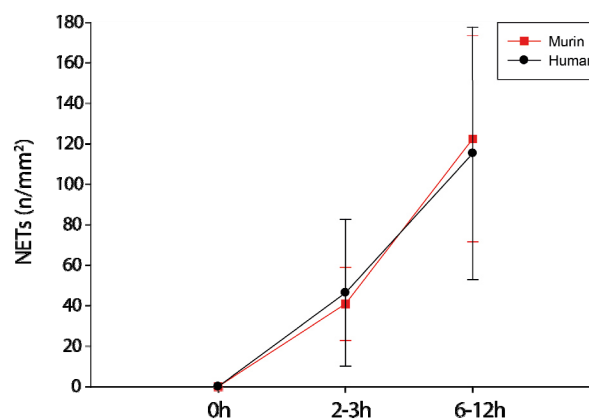


Abbildung 26: Korrelation zwischen Thrombusalter und Anzahl der NETs

Darstellung der humanen (schwarz) und der murinen (rot) Werte. Bei Mensch und Maus gab es jeweils eine signifikante Erhöhung der NETs-Zahl zwischen den 2-5h und 6-12h alten Thromben ($p=0,422$ und Effektgröße: 1,71/ human, $p=0,200$ und Effektgröße: 3,69/ murin). Die Punkte entstanden durch die Ermittlung der Mittelwerte der einzelnen Versuchsgruppen (murin $n = 5$ und human $n = 12$) und sind mit dem SD dargestellt. Die Zunahme innerhalb beider Gruppen zwischen Beginn (0 h), 2-5h und 6-12h ist jeweils ähnlich signifikant.

Mit diesen Analysen ist deutlich geworden, dass NETs an der Entstehung von Thromben gleichermaßen beim Menschen und in der Maus beteiligt sind.

V. DISKUSSION

1. Zentrale Erkenntnisse dieser Arbeit

Für diese Arbeit wurden humane arterielle Tromben mit Thromben muriner translationaler Modelle verglichen. Während die humanen Thromben Patienten im Zuge einer perkutanen koronaren Intervention entnommen wurden, wurden die murinen Thromben experimentell induziert. Im experimentellen Mausmodell wurde eine Endotheldenudation entweder durch einen intravasalen Draht oder mittels extravasaler Eisen-III-Chlorid-Applikation in den Arteriae carotides generiert. Im Vergleich zwischen den beiden am häufigsten genutzten murinen arteriellen Thrombosemodellen, kristallisierte sich das Eisen-III-Chlorid-Modell als das bessere Vergleichsmodell zu humanen arteriellen Thromben heraus. Die Thromben dieses murinen arteriellen Thrombosemodells waren den humanen Thromben makroskopisch am ähnlichsten. Die Auswertung der Immunfluoreszenz der Thrombusschnitte zeigte in beiden Spezies vergleichbare Zellzahlen von Thrombozyten, vor allem Leukozyten und deren Untergruppen.

Neben den oben genannten Komponenten und dem Vergleich der beiden Spezies lag der zentrale Fokus auf der Untersuchung von Neutrophil Extracellular Traps und deren möglicher Rolle bei der Entstehung und Stabilisierung arterieller Thromben. Zum einen gelang der Nachweis von NETs durch die histologische Analyse von Thromben in beiden Spezies, zum anderen wurde die funktionelle Rolle der NETs in der arteriellen Thrombose untersucht.

Hierfür wurde im murinen Eisen-III-Chlorid-Modell, mittels Cl-amidine die Bildung von NETs inhibiert. Hierdurch war die Thrombusentstehung in den Aa. carotides deutlich verzögert und die Stabilität der Thromben herabgesetzt im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe. Aufgrund dieser Ergebnisse kann NETs eine entscheidende Rolle für die Stabilität von arteriellen Thromben zugesprochen werden. Diese Erkenntnisse geben Anlass zu der Vermutung, dass NETs eventuell ein neues Target in der Therapie der arteriellen Thrombose darstellen könnten. Dies ist bereits Bestandteil aktueller Forschung.

2. Diskussion der Methoden

2.1. Wahl der Maus als Versuchstier

Die Maus eignet sich sehr gut als Versuchstier für translationale Modelle. Sie ist durch die etablierten Wildtyp- und Knockoutstämme besonders vielseitig einsetzbar. Mäuse sind aufgrund der schnellen Nachzuchtmöglichkeit, mit einer Graviditätsdauer von 19-21 Tagen sehr gut für die Nachzucht geeignet. Zudem sind die Bedingungen für Haltung und Zucht gut etabliert und standardisiert und im Rahmen der Forschung tierschutzkonform umsetzbar.

Der in dieser Versuchsreihe verwendete Mausstamm C57BL/6J ist einer der bekanntesten und meistgenutzten Inzuchtstämme. Der Vorgänger dieses Stammes wurde 1921 erstmals durch Clarence Cook Little gezüchtet¹²⁰. Der Inzuchtstamm an sich charakterisiert sich durch den nahezu identischen genetischen Hintergrund aller Individuen. Dies schafft die Grundlage für eine hohe Reproduzierbarkeit, Vergleichbarkeit der Versuche, sowie Validität der Ergebnisse. Um diese Grundlage zu manifestieren, wurden weitere Einflussfaktoren wie Transportstress, Haltung, Alter und das Geschlecht der Tiere berücksichtigt. So zeigten Tuli et al., dass Mäuse zwar innerhalb von 24 Stunden nach dem Transport einen normalen Corticosteronspiegel erreichten, jedoch empfahlen sie aufgrund von Verhaltensbeobachtungen mindestens eine Ruhezeit von 4 Tagen einzuhalten, um eine vollständige Akklimatisierung der Tiere zu gewährleisten¹²¹. Aus diesem Grund wurden die für diese Arbeit genutzten Tiere stets für mindestens eine Woche im neuen Käfig- und Gruppenverband belassen und aus den gleichen Haltungsbedingungen in den Versuch genommen. Zudem wurden die Versuchsgruppen so zusammengestellt, dass die Mäuse sich im selben Alter befanden und zu gleichen Anteilen weibliche und männliche Tiere verwendet wurden.

2.2. Wahl der murinen arteriellen Thrombose-Modelle

Verschiedene *in vivo*-Mausmodelle haben zeigen können, welche Mechanismen in der Maus an der Entstehung der arteriellen Thrombose beteiligt sind. Inwieweit dies allerdings mit der Entstehung von humaner arterieller Thrombose vergleichbar ist, konnte bis jetzt noch nicht ausreichend geklärt werden^{3,4}. Es gibt diverse *in vivo*-Mausmodelle, die die Entstehung eines arteriellen Thrombus auslösen können. Die Gemeinsamkeit dieser Methoden ist es einen Schaden am

Endothel hervorzurufen. Dies ist zum einen mechanisch durch das Einführen eines Drahtes, der intravasal am Endothel entlang gezogen wird, und durch die extravasale Applikation von Eisen-III-Chlorid möglich. Ein weiterer Auslöser für arterielle Thrombose in der Maus ist die intravasale Applikation der photoreaktiven Substanz Rose Bengal^{122,123}. Die Gesamtheit aller Methoden für arterielle und venöse Thrombose, sowie Thrombolyse wurde von Day und Westrick et al. zusammengefasst^{3,124}.

Ziel des Vergleiches dieser Arbeit war es zu untersuchen, inwiefern die Mechanismen der Thrombusbildung in der Maus auf den Menschen zutreffen und welches Modell am ehesten mit den für diese Arbeit rekrutierten humanen Koronarthromben vergleichbar ist.

In dieser Arbeit lag der Fokus auf der Drahtdenudation- und der Eisen-III-Chlorid-Methode. Beide Modelle wurden auf bestimmte Kriterien hin untersucht, um letztendlich das Modell mit den meisten Übereinstimmungen zu den Koronarthromben dieser Arbeit zu finden.

Die Methode der Endotheldenudation durch eine intravasale Gefäßverletzung in der Maus wurde erstmals 1993 beschrieben⁴. Lindner et al. wollten mit Hilfe dieser Methode eine vollständige Denudation des Endothels in den betroffenen Gefäßen erreichen. Für diese Arbeit war es entscheidend okklusive und kompakte Thromben zu generieren. Die aus diesem Modell generierten Thromben waren klein, teils gefäßokkludierend und wiesen keine kompakte Masse auf. Aus diesem Grund wurde diese Methode nicht als Vergleichsmodell zu den humanen Thromben gewählt. Im Gegensatz dazu waren die Thromben des Eisen-III-Chlorid-Modells gefäßokkludierend und besaßen ähnlich den humanen Thromben eine kompakte Struktur. Bereits in der Vergangenheit konnten Farrehi et al. zeigen, dass Thromben, generiert durch dieses murine Modell, den humanen Thromben makroskopisch sehr ähnlich sind¹²⁵.

2.2.1. Grenzen des Modells

Die Etablierung translationaler Modelle strebt eine hohe Vergleichbarkeit zu pathophysiologischen Zuständen im Menschen an. Jedoch besitzt diese Vergleichbarkeit Grenzen, die im Folgenden für das hier verwendete Modell aufgeführt sind:

Die Thromben der beiden Spezies die im Vergleich für diese Arbeit entstanden, unterscheiden sich in der Lokalisation und im Entstehungsprozess. So stammen die humanen Thromben aus den Koronararterien und die murinen Thromben aus den Arteriae carotides. Der humane arterielle Thrombus entsteht durch die Ruptur einer arteriosklerotischen Plaque und der damit verbundenen Endothelverletzung. Diese Endothelverletzung wird im murinen Modell im Gegensatz dazu durch extravasal aufgetragenes Eisen-III-Chlorid hervorgerufen. Trotz dieser unterschiedlichen Lokalisationen und Entstehungsprozesse sind sich die Thromben makroskopisch sehr ähnlich. Dennoch muss bedacht werden, dass sich Maus und Mensch in der Quantität einzelner Blutzellgruppen unterscheiden. So weist die Maus ein lymphozytäres, der Mensch ein granulozytäres Blutbild auf¹²⁶. Zudem ist die Anzahl humaner Thrombozyten¹²⁷ niedriger als in der Maus. Diese besitzt eine bis zu 4mal höhere Anzahl an Thrombozyten als der Mensch. (Maus: $450-1690 \times 10^9/l$ ¹²⁷ und Mensch: $140-440 \times 10^9/l$ ¹²⁸). Zudem ist das Volumen der murinen Thrombozyten in Relation zu den humanen Zellen um die Hälfte kleiner¹²⁹ (Maus: MPV $4.7 \pm 0.3 \text{ fl}$ ¹²⁹ und Mensch: $7.5-10 \text{ fl}$ ¹³⁰). Doch Ware et al. nehmen an, dass die höhere Zellzahl zusammen mit der kleineren Größe in einer ähnlichen Zellmasse resultiert wie die humaner Thromben¹³¹.

2.3. Die Verwendung von Cl-amidine im murinen Modell zur Ermittlung des Einflusses von NETs auf die Thrombusstabilität

Um den Einfluss von NETs auf die Thrombusstabilität untersuchen zu können, wurde im murinen Eisen-III-Chlorid-Modell eine adäquate Möglichkeit der NETs-Degradierung gesucht, die sich in dem PAD Inhibitor Cl-amidine fand. Hierbei handelt es sich um einen Inhibitor von PAD 2,3 und 4.

Cl-amidine unterbindet in neutrophilen Granulozyten diverse Umbauvorgänge des Chromatins in der Vorbereitung auf die Ausbildung von NETs, indem er die posttranslationale Hydrolyse von Arginin zu Citrullin unterbindet¹³². Knight et al. zeigten, dass Cl-amidine in einem murinen Lupus-Modell zur Reduzierung der NETs-Anzahl führte⁹⁶.

In dieser Arbeit zeigte sich in der PAD-Versuchsreihe ein signifikant reduziertes Thrombuswachstum im Vergleich zur Kontrollgruppe. NETs konnte somit eine bedeutende Rolle für die Stabilität und Integrität des arteriellen Thrombus in der Maus zugesprochen werden. Aufgrund der in dieser Arbeit gezeigten

Vergleichbarkeit zwischen murinen und humanen arteriellen Thromben, kann davon ausgegangen werden, dass NETs auch bei der Stabilisierung arterieller Thromben im Menschen eine Rolle spielen.

In der Literatur ist neben der Verwendung von PAD-Inhibitoren, auch der Einsatz von DNase 1 beschrieben. DNase1 ist ein Enzym, welches extrazelluläre DNA abbaut und folglich in der Lage ist NETs zu degradieren¹³³ und antithrombotisch wirkt¹³⁴. DNase 1 wurde bisher erfolgreich im venösen murinen Thrombosemodell zur Degradierung von NETs angewendet¹³⁵. Im arteriellen murinen Thrombosemodell konnten Kannemeier et al. DNase jedoch eine prothrombotische Wirkung zusprechen, da sie im Vergleich mit RNase und einem FXII-Inhibitor die kürzeste Zeit bis zur Thrombusbildung zeigte¹³⁶.

3. Diskussion der Ergebnisse

3.1. Die arterielle Thrombose entsteht aus der Interaktion zwischen Thrombozyten, Leukozyten und Faktoren des Gerinnungssystems

In den histologischen Untersuchungen der humanen und murinen Thromben konnten vergleichbare Anzahlen von Thrombozyten und Leukozyten zwischen den beiden Spezies ermittelt werden. Arterielle Thrombose wird im Menschen initial durch die Ruptur einer arteriosklerotischen Plaque ausgelöst. Dies führt intravasal zu einer Thrombozytenadhäsion, Aktivierung und Aggregation⁶³. An diesem Prozess sind nach Jackson et al. bestimmte Thrombozytenrezeptoren und subendotheliale Liganden beteiligt. Dazu gehören der GPIb-GPV-GPIX-Komplex, welcher an den vWF bindet und der GPVI und das Integrin $\alpha 2\beta 1$, welche an Kollagen binden. Zudem bindet das Integrin $\alpha 5\beta 1$ an Fibronektin und das Integrin $\alpha 6\beta 1$ an Laminin. Und des Weiteren werden der von-Willebrand-Faktor, Fibrin und Fibrinogen durch das Integrin $\alpha \text{IIb}\beta 3$ gebunden¹³⁷. Neben Thrombozyten ist die Aktivierung der Koagulation und die dadurch entstehende Fibrinformierung entscheidend an der Thrombusentwicklung und Stabilisierung beteiligt^{63,138-141}. Neben der Detektion von Thrombozyten und Leukozyten konnten Komponenten der Gerinnungskaskade, FXII und Fibrin/Fibrinogen nachgewiesen werden. FXII ist die Initiator Protease, die die Koagulationskaskade einleitet. FXII kann auf unterschiedliche Weisen aktiviert werden, z. B. durch das Binden an die negativ geladene Oberfläche von NETs^{90,91,142}. In diesem Zusammenhang konnte neben FXII auch Fibrin nachgewiesen werden, welches

das Endprodukt der Koagulationskaskade ist und zur endgültigen Stabilisierung des Thrombus benötigt wird. Daraus kann geschlossen werden, dass durch die nachgewiesene Präsenz von NETs es zu einer intravasalen Aktivierung von FXII kommt, was wiederum zu einer vermehrten Fibrinbildung führt und somit letztendlich die arterielle Thrombose aufrecht erhält und den sich entwickelnden Thrombus pathologisch im Gefäßsystem stabilisiert. Diese Mechanismen führen wie durch von Brühl et al. gezeigt werden konnte, auch zur Entstehung der venösen Thrombose⁹¹. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass es ohne FXII zu einer deutlichen Reduzierung in der Formierung und Stabilisierung von Thromben kommt, jedoch die Blutungszeit unverändert ist¹⁴³. Dies könnte bedeuten, dass FXII eine bedeutende Rolle in der Thrombusentstehung spielt und dabei den Ablauf der physiologischen Hämostase nicht beeinflusst. Diese Tatsache könnte einen interessanten neuen Therapieansatz in der Behandlung arterieller Thrombose darstellen. Denn dadurch könnte die Thrombusbildung reduziert und zeitgleich die Gerinnung unbeeinflusst bleiben.

3.2. Die Bedeutung von NETs für die arterielle Thrombusstabilisierung

Der akute Myokardinfarkt ist eine der Haupttodesursachen in unserer heutigen Gesellschaft. Bei Mäusen konnte gezeigt werden, dass Thrombozyten und die Koagulationskaskade an der Entstehung der arteriellen Thrombose beteiligt sind. Dabei wurde deutlich, dass aktivierte Thrombozyten die Koagulationskaskade direkt initiieren können. Dennoch ist für die Thrombusstabilisierung und das Wachstum die Beteiligung von Zellen des angeborenen Immunsystems notwendig. Dieser Prozess wird als „Immunothrombose“⁴⁹ bezeichnet. Es gibt bereits Hinweise, dass die Mechanismen der Immunothrombose auch beim Menschen eine Bedeutung in der Entstehung der arteriellen Thrombose spielen. So konnten Mangold et al. eine positive Korrelation zwischen der Anzahl von NETs in koronaren Thromben mit der Infarktgröße im MRT nachweisen¹⁴⁴.

Innerhalb der Gruppe der Leukozyten konnten als quantitativ größte Zellgruppe neutrophile Granulozyten differenziert werden. Hierbei zeigte sich, dass in murinen und humanen Thromben vergleichbare Anzahlen dieses Zelltyps vorkommen. Sie unterschieden sich lediglich in ihrer Anordnung innerhalb der Thrombusmasse. Neutrophile Granulozyten waren aus der Zellgruppe der Leukozyten, die am häufigsten vorkommende Zellart. Dies war auch bei der Maus der Fall, obwohl der Mensch im Gegensatz zur Maus ein granulozytäres Blutbild

besitzt, also Granulozyten innerhalb der Leukozyten prozentual am häufigsten vorkommen.

Immunothrombose ist ein physiologischer Prozess zur Pathogenbekämpfung, bei dem Zellen des Immunsystems die Koagulationskaskade aktivieren, um die Ausbreitung von Pathogenen im Wirt zu verhindern und die Bekämpfung von Pathogenen zu erleichtern⁴⁹. Die dabei von neutrophilen Granulozyten ausgebildeten NETs sind zentrale Schlüsselemente. Erst kürzlich wurde gezeigt, dass NETs bei der Entstehung der venösen Thrombose eine entscheidende Rolle spielen⁹¹.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es durch die Injizierung von Cl-amidine zu einer verlangsamten Thrombusentstehung kam. Zudem wurde eine reduzierte Thrombusstabilität beobachtet. Dieser Effekt ist am ehesten darauf zurück zu führen, dass Cl-amidine durch die Hemmung von PAD 4 zu einer Hemmung der Ausbildung von NETs führt und somit deren prothrombotische katalytische Eigenschaft in der Entstehung der arteriellen Thrombose wegfällt. NETs enthalten diverse antibakterielle Komponenten, wie die neutrophile Elastase, sind negativ geladen und sind somit in der Lage Thrombozyten und andere prokoagulatorische Faktoren wie FXII zu binden und zu aktivieren^{91,145}. Neutrophile Elastase, welche auf der Oberfläche von NETs gebunden ist, degradiert körpereigene Koagulationsinhibitoren wie TFPI. Dadurch wird die physiologische Gegenregulation der eingeleiteten Koagulationskaskade unterbunden. Zudem können NETs an TF binden, welcher durch z.B. die Proteindisulfid-Isomerase aktiviert wird¹⁴⁵. Aktivierter intravaskulärer TF kann dann wiederum die extrinsische Koagulationskaskade aktivieren und so zu Thrombinbildung und einhergehenden Fibrinbildung führen. Die Fibrinbildung stabilisiert den Thrombus und ist essentiell für dessen Aufrechterhaltung.

In NE-Knockout Mäusen konnte eine verlängerte Blutungszeit und eine reduzierte Thrombusstabilität beobachtet werden⁹⁰. Neben der entscheidenden Funktion von NE wird auch NETs eine große Bedeutung im Zuge der Entstehung von arterieller Thrombose zugesprochen^{74,82}.

Durch die Immunfluoreszenz-Färbung der histologischen Thrombusschnitte konnten NETs in murinen sowie humanen Thromben nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurde die Bedeutung und funktionale Rolle von NETs im Vergleich

zwischen Maus und Mensch untersucht.

3.3. Einflussfaktoren auf die Versuchsergebnisse dieser Arbeit

Im Zuge dieser Arbeit kristallisierten sich verschiedene Faktoren heraus, die Einfluss auf die Ergebnisse dieser Arbeit genommen haben könnten. So muss bedacht werden, dass es während des Absaugprozesses der humanen Thromben im Einzelfall zu einer Zerstörung der ursprünglich kompakten und intakten Masse des Thrombus gekommen sein könnte. Aufgrund der postmortalen Entnahme der murinen Thromben im intakten Gefäßverbund, war es nur hier möglich die Interaktion zwischen Endothel und Thrombus zu beurteilen.

Trotz der unterschiedlichen Herkunft von murinen und humanen Thromben, konnten große Analogien zwischen den beiden Spezies festgestellt werden. Das Alter der murinen Thromben dieser Studie liegt bei 3-6h und das Alter der humanen Thromben liegt bei unter 24 h. Es zeigte sich jedoch keine signifikante Korrelation zwischen dem Alter der Thromben und der Zellzahl an Leukozyten.

In 20% (n=20) der gesammelten humanen Thromben konnten NETs nachgewiesen werden. Diese Tatsache wird dem Umstand zugesprochen, dass Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt Leitlinien gerecht möglichst früh intravenös Heparin verabreicht bekommen, meist schon vom Notarzt vor dem Eintreffen in die Klinik, um die Aktivierung der Gerinnung zu unterbinden. Es konnte gezeigt werden, dass Heparin, als Antikoagulanzen eine NETs-Degradierung *in vitro*⁶⁸ und *in vivo*⁹¹ zur Folge hat, und somit die Stabilisierung des arteriellen Thrombus unterbindet. Des Weiteren könnten interindividuelle Unterschiede der Konzentration von DNase 1 im Koronarblut der Patienten zu diesen Ergebnissen führen. DNase 1 kann extrazellulär DNA spalten und Mangold et al. fanden eine negative Korrelation zwischen DNase 1-Konzentrationen im Blut der Patienten zur Anzahl von NETs in den untersuchten Koronarthromben¹⁴⁴. Bezüglich der Anzahl der NETs, war diese ähnlich zwischen murinen und humanen Thromben. Die Anzahl der NETs nahm mit dem Alter der Thromben zu.

4. Ausblick

Die Einflussnahme auf Faktoren der Immuno­thrombose hat gezeigt, dass bei Mäusen arterielle Thrombose verhindert werden konnte⁹⁰, daher könnte die Fokussierung auf bestimmte Schlüsselfaktoren der Immuno­thrombose, einen neuen Ansatz in der Therapie der arteriellen Thrombose des Menschen darstellen, ohne die physiologische Hämostase stark zu beeinflussen.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Der akute Myokardinfarkt ist eine der Haupttodesursachen in unserer heutigen Gesellschaft.

Bisher konnte gezeigt werden, dass Thrombozyten und die Koagulationskaskade an der Entstehung der arteriellen Thrombose beteiligt sind. Dabei wurde deutlich, dass aktivierte Thrombozyten die Koagulationskaskade direkt initiieren können. Dennoch ist für die Thrombusstabilisierung und das Wachstum, die Beteiligung von Zellen des angeborenen Immunsystems von essentieller Bedeutung. Dieser Prozess wird als Immunothrombose bezeichnet. Im Zuge dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Schlüsselfaktoren der Immunothrombose sowohl in der Maus als auch beim Menschen zu finden sind.

Die histologische Auswertung von arteriellen Thromben aus zwei verschiedenen Mausmodellen und humanen Thromben ergab, dass Thromben die durch das Eisen-III-Chlorid-Modell gewonnen wurden den humanen koronaren Thromben dieser Arbeit mikroskopisch und makroskopisch am ähnlichsten waren.

Sowohl Thrombozyten, Fibrinogen, als auch Entzündungszellen wurden in vergleichbaren Maße in den murinen Thromben des Eisen-III-Chlorid-Modells und den humanen koronaren Thromben gefunden.

Durch die Verwendung von Cl-amidine im Tierversuch des Eisen-III-Chlorid-Modells konnte eine funktionelle Rolle der NETs in der arteriellen murinen Thrombose gezeigt werden. Somit stellt die Beeinflussung von Faktoren der Immunothrombose einen vielversprechenden Ansatz für neue antithrombotische Therapien dar.

VII. SUMMARY

In our today's society the acute myocardial infarction is one of the main causes of death.

So far, we could show that platelets and the coagulation cascade participate in the development of arterial thrombosis. It became clear that activated platelets can directly initiate the coagulation cascade. The participation of immune cells is essential for the stability and the growth of an arterial thrombus. This process is termed 'immunothrombosis'. In the course of this work, we could show that key factors of immunothrombosis are found in mice as well as in humans.

The histological analysis of arterial thrombi of two different mouse models and human thrombi resulted in the fact that thrombi generated from the ferric-chloride-model were most similar to the human thrombi, microscopically and macroscopically.

Platelets, fibrinogen, as well as inflammatory cells were found to an equal extent in the murine thrombi of the ferric-chloride-model and the human coronary thrombi.

Due to the usage of Cl-amidine in the animal experiment of the ferric-chloride-model, a functional role of NETs in the development of arterial thrombosis could be shown. Therefore, affecting factors of immunothrombosis is a promising approach for new anticoagulant therapies.

VIII. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A.	Arterie	MRT	Magnetresonanztomographie
Aa.	Arteriae	n	Anzahl
ACE	Angiotensin Converting Enzyme	NaCl	Natriumchlorid
ACVB	Koronararterienbypass	NADPH	Nicotinamidadeninukleotidphosphat
ADP	Adenosindiphosphat	NE	Neutrophile Elastase
CD	Cluster of differentiation	Neg. KO	Negativkontrolle
CK-MB	Muscle-brain type Creatinkinase	NETs	Neutrophil Extracellular Traps
CLEC-2	C-type-lectin like receptor	NO	Nitritoxid
COX	Cyclooxygenase-1	NSTEMI	Nicht-ST-Hebungsinfarkt
CRP	C-reactives-Protein	OP	Operation
DCF	Dihydrodichlorofluoreszein	oxLDL	oxidiertes low-density lipoprotein
DNA	Desoxyribonucleinsäure	PAD	Peptidylarginin-Deiminase
DNase	Desoxyribonucleinase	PBS	Phosphat buffered saline
ECM	Extracellular matrix	PDI	Proteindisulfid-Isomerase
EF	Ejektionsfraktion	PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand 1
EKG	Echokardiographie	RCA	Right coronary artery
FeCl ₃	Eisen-III-Chlorid	RNase	Ribonuclease
GP	Glykoprotein	ROS	Reactive oxygen species
h	Stunde	SD	Standard deviation
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid	SMCs	Smooth muscle cells
HDL	High-density lipoprotein	STEMI	ST-Hebungsinfarkt
HE	Hämatoxylin-Eosin	TFPI	Tissue factor pathway inhibitor
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1	TLR	Toll-like-receptor
IVM	Intravitalmikroskopie	V.	Vena
LAD	left anterior descending	VCAM-1	Vascular adhesion molecule 1
LCx	left circumflex artery	VLA	Very late activation antigen
LDL	Low-density lipoprotein	VLDL	Very low density lipoprotein
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen 1	vWF	von-Willebrand-Faktor
LPS	Lipopolysaccharid	WHO	World Health Organisation
MAC-1	Macrophage-1 antigen	WT	Wildtyp
	Monocyte		
MCP-1	chemoattractant protein-1/ CCL2		
mmHg	Millimeter Quecksilbersäure		
MPO	Myeloperoxidase		
MPV	Mean platelet volume		

IX. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Aufbau der Arterienwand modifiziert nach Waibl et al. ⁶	2
Abbildung 2: Entstehung einer arteriosklerotischen Plaque (mit freundlicher Genehmigung von ³⁵)	8
Abbildung 3: Extravasale Eisenchlorid-Applikation	24
Abbildung 4: Indirekte Nachweismethode	30
Abbildung 5: Immunfluoreszenzdarstellung der Thrombozytenfläche	36
Abbildung 6: Darstellung von neutrophilen Granulozyten in murinen Thromben	38
Abbildung 7: Quantifizierung von Leukozyten und neutrophilen Granulozyten	38
Abbildung 8: Zusammenhang zwischen der Anzahl der Leukozyten und dem Thrombusalter in Thromben aus dem Eisen-III-Chlorid-Modell	39
Abbildung 9: Übersicht der gesammelten humanen Thromben	40
Abbildung 10: Aufteilung der Thromben nach Alter (n=55)	41
Abbildung 11: Beispielbilder eines humanen Thrombus in Hämatoxylin-Eosin-Färbung	42
Abbildung 12: Vergleich der Thrombozytenfläche zwischen Maus und Mensch	42
Abbildung 13: Vergleich der Thrombozytenaggregationsfläche von murinen Eisen-III-Chlorid- und humanen Thromben	43
Abbildung 14: Nachweis von Leukozyten in humanen Thromben	43
Abbildung 15: Leukozyten und Neutrophile pro mm ² in humanen koronaren Thromben	44
Abbildung 16: Zusammenhang zwischen Leukozytenzahl und Thrombusalter (n=36)	45
Abbildung 17: FXII Nachweis	45
Abbildung 18: Fibrinogen/Fibrin-Nachweis	46
Abbildung 19: Vergleich des Fibrinogen/Fibrin-Anteils zwischen murinen Eisen-	

III-Chlorid (n=3) und humanen Thromben (n=7)	46
Abbildung 20: Murine Neutrophil Extracellular Traps	47
Abbildung 21: Intravitalmikroskopie nach Eisen-III-Chlorid-Behandlung und Cl- amidine-Gabe	48
Abbildung 22: Zeit bis zum Verschluss	48
Abbildung 23: Dauer des Verschlusses	49
Abbildung 24: Neutrophil Extracellular Traps	50
Abbildung 25: Quantifizierung der NETs von Mensch (n=12) und Maus (n=5)	51
Abbildung 26: Korrelation zwischen Thrombusalter und Anzahl der NETs	51

X. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Murine Antikörper	32
Tabelle 2: Humane Antikörper	32
Tabelle 3: Färbekontrollen	33
Tabelle 4: Baselinecharakteristika	41

XI. LITERATURVERZEICHNIS

1. Statistisches Bundesamt. ICD-10, Häufigste Todesursachen Wiesbaden: Statistisches Bundesamt; 2013.
2. WHO. Cardiovascular diseases (CVDs). Vol. Fact sheet N°317 (WHO, 2015).
3. Day, S.M., Reeve, J.L., Myers, D.D. & Fay, W.P. Murine thrombosis models. *Thrombosis and haemostasis* 92, 486-494 (2004).
4. Lindner, V., Fingerle, J. & Reidy, M.A. Mouse model of arterial injury. *Circulation research* 73, 792-796 (1993).
5. Sachs, U.J. & Nieswandt, B. In vivo thrombus formation in murine models. *Circulation research* 100, 979-991 (2007).
6. Waibl, H., Wilkens, H. & Münster, W. Arterien, Arteriae. in *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere - Band III Kreislaufsystem, Haut und Hautorgane*, Vol. 4. (Hrsg. Nickel, R., Schummer, A. & Seiferle, E.). Parey, Stuttgart (2005).
7. Rainer, K., Hans-Christian, P., Armin, K., Stefan, S. & al., e. Das Kreislaufsystem. in *Physiologie*, Vol. 6. Hrsg. Heimo, E.). 177-179 Thieme (2010).
8. Ullrich, W. & Wolfgang, K. Organe des Kreislauf und Lymphgefäße. in *Lehrbuch Histologie*, Vol. 4. (Hrsg. Ullrich, W., Wolfgang, K. & Thomas, D.). 237-242 Urban & Fischer, München (2014).
9. Mönckeberg, J.G. Über die reine Mediaverkalkung der Extremitätenarterien und ihr Verhalten zur Arteriosklerose. *Virchows Arch. path Anat.* 171, 141-167 (1903).
10. Jayalath, R.W., Mangan, S.H. & Golledge, J. Aortic calcification. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery* 30, 476-488 (2005).
11. Witteman, J.C., Grobbee, D.E., Valkenburg, H.A., van Hemert, A.M., Stijnen, T. & Hofman, A. Cigarette smoking and the development and progression of aortic atherosclerosis. A 9-year population-based follow-up study in women. *Circulation* 88, 2156-2162 (1993).
12. Sumida, H., Watanabe, H., Kugiyama, K., Ohgushi, M., Matsumura, T. & Yasue, H. Does passive smoking impair endothelium-dependent coronary artery dilation in women? *Journal of the American College of Cardiology* 31, 811-815 (1998).
13. Rickenbacher, P. [Update arterial hypertension 2015]. *Praxis* 104, 461-465 (2015).
14. Cosentino, F., Eto, M., De Paolis, P., van der Loo, B., Bachschmid, M., Ullrich, V., Kouroedov, A., Delli Gatti, C., Joch, H., Volpe, M. & Luscher, T.F. High glucose causes upregulation of cyclooxygenase-2 and alters prostanoid profile in human endothelial cells: role of protein kinase C and reactive oxygen species. *Circulation* 107, 1017-1023 (2003).
15. Bonora, E., Tessari, R., Micciolo, R., Zenere, M., Targher, G., Padovani, R., Falezza, G. & Muggeo, M. Intimal-medial thickness of the carotid artery in nondiabetic and NIDDM patients. Relationship with insulin resistance. *Diabetes care* 20, 627-631 (1997).
16. Wild, S.H., Byrne, C.D., Tzoulaki, I., Lee, A.J., Rumley, A., Lowe, G.D. & Fowkes, F.G. Metabolic syndrome, haemostatic and inflammatory

- markers, cerebrovascular and peripheral arterial disease: The Edinburgh Artery Study. *Atherosclerosis* 203, 604-609 (2009).
17. Nakashima, Y., Fujii, H., Sumiyoshi, S., Wight, T.N. & Sueishi, K. Early human atherosclerosis: accumulation of lipid and proteoglycans in intimal thickenings followed by macrophage infiltration. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 27, 1159-1165 (2007).
 18. Keating, F.K., Sobel, B.E. & Schneider, D.J. Effects of increased concentrations of glucose on platelet reactivity in healthy subjects and in patients with and without diabetes mellitus. *The American journal of cardiology* 92, 1362-1365 (2003).
 19. McDonald, J.W., Dupre, J., Rodger, N.W., Champion, M.C., Webb, C.D. & Ali, M. Comparison of platelet thromboxane synthesis in diabetic patients on conventional insulin therapy and continuous insulin infusions. *Thrombosis research* 28, 705-712 (1982).
 20. Herold, G. *Innere Medizin* 2015. Herold, Gerd, Köln (2014).
 21. Nathan, L. & Chaudhuri, G. Estrogens and atherosclerosis. *Annual review of pharmacology and toxicology* 37, 477-515 (1997).
 22. Ku, D.N., Giddens, D.P., Zarins, C.K. & Glagov, S. Pulsatile flow and atherosclerosis in the human carotid bifurcation. Positive correlation between plaque location and low oscillating shear stress. *Arteriosclerosis (Dallas, Tex.)* 5, 293-302 (1985).
 23. Ross, R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *The New England journal of medicine* 340, 115-126 (1999).
 24. Knowles, J.W., Reddick, R.L., Jennette, J.C., Shesely, E.G., Smithies, O. & Maeda, N. Enhanced atherosclerosis and kidney dysfunction in eNOS(-/-)Apoe(-/-) mice are ameliorated by enalapril treatment. *The Journal of clinical investigation* 105, 451-458 (2000).
 25. Gryglewski, R.J., Palmer, R.M. & Moncada, S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 320, 454-456 (1986).
 26. Nievelstein-Post, P., Mottino, G., Fogelman, A. & Frank, J. An ultrastructural study of lipoprotein accumulation in cardiac valves of the rabbit. *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology / American Heart Association* 14, 1151-1161 (1994).
 27. Reidy, M.A. & Bowyer, D.E. Scanning electron microscopy of arteries. The morphology of aortic endothelium in haemodynamically stressed areas associated with branches. *Atherosclerosis* 26, 181-194 (1977).
 28. Levesque, M.J., Liepsch, D., Moravec, S. & Nerem, R.M. Correlation of endothelial cell shape and wall shear stress in a stenosed dog aorta. *Arteriosclerosis (Dallas, Tex.)* 6, 220-229 (1986).
 29. Ross, R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362, 801-809 (1993).
 30. Lusis, A.J. Atherosclerosis. *Nature* 407, 233-241 (2000).
 31. Dong, Z.M., Chapman, S.M., Brown, A.A., Frenette, P.S., Hynes, R.O. & Wagner, D.D. The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *The Journal of clinical investigation* 102, 145-152 (1998).
 32. Collins, R.G., Velji, R., Guevara, N.V., Hicks, M.J., Chan, L. & Beaudet, A.L. P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *The Journal of experimental medicine* 191, 189-194 (2000).
 33. Badrnya, S., Schrottmaier, W.C., Kral, J.B., Yaiw, K.C., Volf, I., Schabbauer, G., Soderberg-Naucler, C. & Assinger, A. Platelets mediate

- oxidized low-density lipoprotein-induced monocyte extravasation and foam cell formation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 34, 571-580 (2014).
34. Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I. & Nourshargh, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature reviews. Immunology* 7, 678-689 (2007).
35. Libby, P., Ridker, P.M. & Hansson, G.K. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 473, 317-325 (2011).
36. Stone, G.W., Maehara, A., Lansky, A.J., de Bruyne, B., Cristea, E., Mintz, G.S., Mehran, R., McPherson, J., Farhat, N., Marso, S.P., Parise, H., Templin, B., White, R., Zhang, Z. & Serruys, P.W. A prospective natural-history study of coronary atherosclerosis. *The New England journal of medicine* 364, 226-235 (2011).
37. Wykrzykowska, J.J., Mintz, G.S., Garcia-Garcia, H.M., Maehara, A., Fahy, M., Xu, K., Inguez, A., Fajadet, J., Lansky, A., Templin, B., Zhang, Z., de Bruyne, B., Weisz, G., Serruys, P.W. & Stone, G.W. Longitudinal distribution of plaque burden and necrotic core-rich plaques in nonculprit lesions of patients presenting with acute coronary syndromes. *JACC. Cardiovascular imaging* 5, S10-18 (2012).
38. Davies, M.J. Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis. The Paul Dudley White Lecture 1995. *Circulation* 94, 2013-2020 (1996).
39. Depta, J.P. & Bhatt, D.L. New approaches to inhibiting platelets and coagulation. *Annual review of pharmacology and toxicology* 55, 373-397 (2015).
40. Roffi, M., Patrono, C., Collet, J.P., Mueller, C., Valgimigli, M., Andreotti, F., Bax, J.J., Borger, M.A., Brotons, C., Chew, D.P., Gencer, B., Hasenfuss, G., Kjeldsen, K., Lancellotti, P., Landmesser, U., Mehilli, J., Mukherjee, D., Storey, R.F. & Windecker, S. 2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: Task Force for the Management of Acute Coronary Syndromes in Patients Presenting without Persistent ST-Segment Elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *European heart journal* (2015).
41. Bennett, C.L., Davidson, C.J., Raisch, D.W., Weinberg, P.D., Bennett, R.H. & Feldman, M.D. Thrombotic thrombocytopenic purpura associated with ticlopidine in the setting of coronary artery stents and stroke prevention. *Archives of internal medicine* 159, 2524-2528 (1999).
42. Gent, M., Blakely, J.A., Easton, J.D., Ellis, D.J., Hachinski, V.C., Harbison, J.W., Panak, E., Roberts, R.S., Sicurella, J. & Turpie, A.G. The Canadian American Ticlopidine Study (CATS) in thromboembolic stroke. *Lancet (London, England)* 1, 1215-1220 (1989).
43. Page, Y., Tardy, B., Zeni, F., Comtet, C., Terrana, R. & Bertrand, J.C. Thrombotic thrombocytopenic purpura related to ticlopidine. *Lancet (London, England)* 337, 774-776 (1991).
44. Gawaz, M. & Geisler, T. Orale Plättchenhemmer. *Der Kardiologe* (2012).
45. Wiviott, S.D., Braunwald, E., McCabe, C.H., Montalescot, G., Ruzyllo, W., Gottlieb, S., Neumann, F.J., Ardissino, D., De Servi, S., Murphy, S.A., Riesmeyer, J., Weerakkody, G., Gibson, C.M. & Antman, E.M. Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *The New England journal of medicine* 357, 2001-2015 (2007).
46. Mauri, L., Kereiakes, D.J., Yeh, R.W., Driscoll-Shempp, P., Cutlip, D.E.,

- Steg, P.G., Normand, S.L., Braunwald, E., Wiviott, S.D., Cohen, D.J., Holmes, D.R., Jr., Krucoff, M.W., Hermiller, J., Dauerman, H.L., Simon, D.I., Kandzari, D.E., Garratt, K.N., Lee, D.P., Pow, T.K., Ver Lee, P., Rinaldi, M.J. & Massaro, J.M. Twelve or 30 months of dual antiplatelet therapy after drug-eluting stents. *The New England journal of medicine* 371, 2155-2166 (2014).
47. Byrne, R.A., Schulz, S., Mehilli, J., Iijima, R., Massberg, S., Neumann, F.J., ten Berg, J.M., Schomig, A. & Kastrati, A. Rationale and design of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial of 6 versus 12 months clopidogrel therapy after implantation of a drug-eluting stent: The Intracoronary Stenting and Antithrombotic Regimen: Safety And Efficacy of 6 Months Dual Antiplatelet Therapy After Drug-Eluting Stenting (ISAR-SAFE) study. *American heart journal* 157, 620-624.e622 (2009).
48. Yusuf, S., Zhao, F., Mehta, S.R., Chrolavicius, S., Tognoni, G. & Fox, K.K. Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. *The New England journal of medicine* 345, 494-502 (2001).
49. Engelmann, B. & Massberg, S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nature reviews. Immunology* 13, 34-45 (2013).
50. Khan, B.V., Harrison, D.G., Olbrych, M.T., Alexander, R.W. & Medford, R.M. Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 9114-9119 (1996).
51. Marcus, A.J., Broekman, M.J., Drosopoulos, J.H., Olson, K.E., Islam, N., Pinsky, D.J. & Levi, R. Role of CD39 (NTPDase-1) in thromboregulation, cerebroprotection, and cardioprotection. *Seminars in thrombosis and hemostasis* 31, 234-246 (2005).
52. Berndt, M.C., Ward, C.M., De Luca, M., Facey, D.A., Castaldi, P.A., Harris, S.J. & Andrews, R.K. The molecular mechanism of platelet adhesion. *Australian and New Zealand journal of medicine* 25, 822-830 (1995).
53. Kroll, M.H., Harris, T.S., Moake, J.L., Handin, R.I. & Schafer, A.I. von Willebrand factor binding to platelet GpIb initiates signals for platelet activation. *The Journal of clinical investigation* 88, 1568-1573 (1991).
54. Suzuki-Inoue, K., Fuller, G.L., Garcia, A., Eble, J.A., Pohlmann, S., Inoue, O., Gartner, T.K., Hughan, S.C., Pearce, A.C., Laing, G.D., Theakston, R.D., Schweighoffer, E., Zitzmann, N., Morita, T., Tybulewicz, V.L., Ozaki, Y. & Watson, S.P. A novel Syk-dependent mechanism of platelet activation by the C-type lectin receptor CLEC-2. *Blood* 107, 542-549 (2006).
55. Massberg, S., Schulz, C. & Gawaz, M. Role of platelets in the pathophysiology of acute coronary syndrome. *Seminars in vascular medicine* 3, 147-162 (2003).
56. Dubois, C., Panicot-Dubois, L., Merrill-Skoloff, G., Furie, B. & Furie, B.C. Glycoprotein VI-dependent and -independent pathways of thrombus formation in vivo. *Blood* 107, 3902-3906 (2006).
57. Nieswandt, B., Brakebusch, C., Bergmeier, W., Schulte, V., Bouvard, D., Mokhtari-Nejad, R., Lindhout, T., Heemskerk, J.W., Zirngibl, H. & Fassler, R. Glycoprotein VI but not $\alpha 2 \beta 1$ integrin is essential for platelet interaction with collagen. *The EMBO journal* 20, 2120-2130 (2001).

58. Hermann, P., Armant, M., Brown, E., Rubio, M., Ishihara, H., Ulrich, D., Caspary, R.G., Lindberg, F.P., Armitage, R., Maliszewski, C., Delespesse, G. & Sarfati, M. The vitronectin receptor and its associated CD47 molecule mediates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes by interaction with soluble CD23. *The Journal of cell biology* 144, 767-775 (1999).
59. Kaspers, B. & Göbel, T. Hämostase. in *Physiologie der Haustiere*, Vol. 2. (Hrsg. von Engelhardt, W. & Breves, G.). Enke Verlag, Stuttgart (2000).
60. Adams, R.L. & Bird, R.J. Review article: Coagulation cascade and therapeutics update: relevance to nephrology. Part 1: Overview of coagulation, thrombophilias and history of anticoagulants. *Nephrology (Carlton, Vic.)* 14, 462-470 (2009).
61. Davie, E.W. & Ratnoff, O.D. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science (New York, N.Y.)* 145, 1310-1312 (1964).
62. Macfarlane, R.G. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. *Nature* 202, 498-499 (1964).
63. Furie, B. & Furie, B.C. Mechanisms of thrombus formation. *The New England journal of medicine* 359, 938-949 (2008).
64. Cho, J., Furie, B.C., Coughlin, S.R. & Furie, B. A critical role for extracellular protein disulfide isomerase during thrombus formation in mice. *The Journal of clinical investigation* 118, 1123-1131 (2008).
65. Morrissey, J.H., Macik, B.G., Neuenschwander, P.F. & Comp, P.C. Quantitation of activated factor VII levels in plasma using a tissue factor mutant selectively deficient in promoting factor VII activation. *Blood* 81, 734-744 (1993).
66. Nakagaki, T., Foster, D.C., Berkner, K.L. & Kisiel, W. Initiation of the extrinsic pathway of blood coagulation: evidence for the tissue factor dependent autoactivation of human coagulation factor VII. *Biochemistry* 30, 10819-10824 (1991).
67. Fuchs, T.A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., Weinrauch, Y., Brinkmann, V. & Zychlinsky, A. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *The Journal of cell biology* 176, 231-241 (2007).
68. Fuchs, T.A., Brill, A., Duerschmied, D., Schatzberg, D., Monestier, M., Myers, D.D., Jr., Wroblewski, S.K., Wakefield, T.W., Hartwig, J.H. & Wagner, D.D. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 15880-15885 (2010).
69. Butcher, E.C. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 67, 1033-1036 (1991).
70. Vandendries, E.R., Furie, B.C. & Furie, B. Role of P-selectin and PSGL-1 in coagulation and thrombosis. *Thrombosis and haemostasis* 92, 459-466 (2004).
71. Dong, Z.M., Brown, A.A. & Wagner, D.D. Prominent role of P-selectin in the development of advanced atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Circulation* 101, 2290-2295 (2000).
72. Burger, P.C. & Wagner, D.D. Platelet P-selectin facilitates atherosclerotic lesion development. *Blood* 101, 2661-2666 (2003).
73. Smith, C.W., Marlin, S.D., Rothlein, R., Toman, C. & Anderson, D.C. Cooperative interactions of LFA-1 and Mac-1 with intercellular adhesion molecule-1 in facilitating adherence and transendothelial migration of human neutrophils in vitro. *The Journal of clinical investigation* 83, 2008-

- 2017 (1989).
74. Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D.S., Weinrauch, Y. & Zychlinsky, A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science (New York, N.Y.)* 303, 1532-1535 (2004).
 75. Clark, S.R., Ma, A.C., Tavener, S.A., McDonald, B., Goodarzi, Z., Kelly, M.M., Patel, K.D., Chakrabarti, S., McAvoy, E., Sinclair, G.D., Keys, E.M., Allen-Vercoe, E., Devinney, R., Doig, C.J., Green, F.H. & Kubes, P. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nature medicine* 13, 463-469 (2007).
 76. Steinberg, B.E. & Grinstein, S. Unconventional roles of the NADPH oxidase: signaling, ion homeostasis, and cell death. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2007, pe11 (2007).
 77. Pilsczek, F.H., Salina, D., Poon, K.K., Fahey, C., Yipp, B.G., Sibley, C.D., Robbins, S.M., Green, F.H., Surette, M.G., Sugai, M., Bowden, M.G., Hussain, M., Zhang, K. & Kubes, P. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 185, 7413-7425 (2010).
 78. Yipp, B.G., Petri, B., Salina, D., Jenne, C.N., Scott, B.N., Zbytniuk, L.D., Pittman, K., Asaduzzaman, M., Wu, K., Meijndert, H.C., Malawista, S.E., de Boisfleury Chevance, A., Zhang, K., Conly, J. & Kubes, P. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nature medicine* 18, 1386-1393 (2012).
 79. Kessenbrock, K., Krumbholz, M., Schonermarck, U., Back, W., Gross, W.L., Werb, Z., Grone, H.J., Brinkmann, V. & Jenne, D.E. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nature medicine* 15, 623-625 (2009).
 80. Garcia-Romo, G.S., Caielli, S., Vega, B., Connolly, J., Allantaz, F., Xu, Z., Punaro, M., Baisch, J., Guiducci, C., Coffman, R.L., Barrat, F.J., Banchereau, J. & Pascual, V. Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Science translational medicine* 3, 73ra20 (2011).
 81. Lande, R., Ganguly, D., Facchinetti, V., Frasca, L., Conrad, C., Gregorio, J., Meller, S., Chamilos, G., Sebasigari, R., Ricciari, V., Bassett, R., Amuro, H., Fukuhara, S., Ito, T., Liu, Y.J. & Gillet, M. Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Science translational medicine* 3, 73ra19 (2011).
 82. Brinkmann, V. & Zychlinsky, A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nature reviews. Microbiology* 5, 577-582 (2007).
 83. Wang, Y., Li, M., Stadler, S., Correll, S., Li, P., Wang, D., Hayama, R., Leonelli, L., Han, H., Grigoryev, S.A., Allis, C.D. & Coonrod, S.A. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *The Journal of cell biology* 184, 205-213 (2009).
 84. Papayannopoulos, V., Metzler, K.D., Hakkim, A. & Zychlinsky, A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *The Journal of cell biology* 191, 677-691 (2010).
 85. Metzler, K.D., Fuchs, T.A., Nauseef, W.M., Reumaux, D., Roesler, J., Schulze, I., Wahn, V., Papayannopoulos, V. & Zychlinsky, A. Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation:

- implications for innate immunity. *Blood* 117, 953-959 (2011).
86. Hampton, M.B., Kettle, A.J. & Winterbourn, C.C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 92, 3007-3017 (1998).
87. Chen, K., Nishi, H., Travers, R., Tsuboi, N., Martinod, K., Wagner, D.D., Stan, R., Croce, K. & Mayadas, T.N. Endocytosis of soluble immune complexes leads to their clearance by FcγRIIb but induces neutrophil extracellular traps via FcγRIIA in vivo. *Blood* 120, 4421-4431 (2012).
88. Weinrauch, Y., Drujan, D., Shapiro, S.D., Weiss, J. & Zychlinsky, A. Neutrophil elastase targets virulence factors of enterobacteria. *Nature* 417, 91-94 (2002).
89. McDonald, B., Urrutia, R., Yipp, B.G., Jenne, C.N. & Kubes, P. Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis. *Cell host & microbe* 12, 324-333 (2012).
90. Massberg, S., Grahl, L., von Brühl, M.L., Manukyan, D., Pfeiler, S., Goosmann, C., Brinkmann, V., Lorenz, M., Bidzhekov, K., Khandagale, A.B., Konrad, I., Kennerknecht, E., Reges, K., Holdenrieder, S., Braun, S., Reinhardt, C., Spannagl, M., Preissner, K.T. & Engelmann, B. Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nature medicine* 16, 887-896 (2010).
91. von Brühl, M.L., Stark, K., Steinhart, A., Chandraratne, S., Konrad, I., Lorenz, M., Khandoga, A., Tirniceriu, A., Coletti, R., Kollnberger, M., Byrne, R.A., Laitinen, I., Walch, A., Brill, A., Pfeiler, S., Manukyan, D., Braun, S., Lange, P., Riegger, J., Ware, J., Eckart, A., Haidari, S., Rudelius, M., Schulz, C., Ehtler, K., Brinkmann, V., Schwaiger, M., Preissner, K.T., Wagner, D.D., Mackman, N., Engelmann, B. & Massberg, S. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *The Journal of experimental medicine* 209, 819-835 (2012).
92. Xu, J., Zhang, X., Monestier, M., Esmon, N.L. & Esmon, C.T. Extracellular histones are mediators of death through TLR2 and TLR4 in mouse fatal liver injury. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 187, 2626-2631 (2011).
93. Xu, J., Zhang, X., Pelayo, R., Monestier, M., Ammollo, C.T., Semeraro, F., Taylor, F.B., Esmon, N.L., Lupu, F. & Esmon, C.T. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nature medicine* 15, 1318-1321 (2009).
94. Semeraro, F., Ammollo, C.T., Morrissey, J.H., Dale, G.L., Friese, P., Esmon, N.L. & Esmon, C.T. Extracellular histones promote thrombin generation through platelet-dependent mechanisms: involvement of platelet TLR2 and TLR4. *Blood* 118, 1952-1961 (2011).
95. Zhang, S., Shu, X., Tian, X., Chen, F., Lu, X. & Wang, G. Enhanced formation and impaired degradation of neutrophil extracellular traps in dermatomyositis and polymyositis: a potential contributor to interstitial lung disease complications. *Clinical and experimental immunology* 177, 134-141 (2014).
96. Knight, J.S., Zhao, W., Luo, W., Subramanian, V., O'Dell, A.A., Yalavarthi, S., Hodgin, J.B., Eitzman, D.T., Thompson, P.R. & Kaplan, M.J. Peptidylarginine deiminase inhibition is immunomodulatory and vasculoprotective in murine lupus. *The Journal of clinical investigation* 123, 2981-2993 (2013).

97. Heavner, J.E. & Cooper, D.M. Pharmacology of Analgesics. in Anesthesia and analgesia in laboratory animals, Vol. 2. Elsevier/Academic Press (2008).
98. Institut für Veterinärpharmakologie und-toxikologie Zürich.
<http://www.vetpharm.uzh.ch2012>.
99. E., G.M. Tranquilizers, α 2-Adrenergic Agonists and Related Agents. Veterinary Pharmacology and Therapeutics 8th Edition, 299-342 (2001).
100. Sinclair, M.D. A review of the physiological effects of alpha2-agonists related to the clinical use of medetomidine in small animal practice. The Canadian veterinary journal. La revue veterinaire canadienne 44, 885-897 (2003).
101. Fay, W.P., Parker, A.C., Ansari, M.N., Zheng, X. & Ginsburg, D. Vitronectin inhibits the thrombotic response to arterial injury in mice. Blood 93, 1825-1830 (1999).
102. Woollard, K.J., Sturgeon, S., Chin-Dusting, J.P., Salem, H.H. & Jackson, S.P. Erythrocyte hemolysis and hemoglobin oxidation promote ferric chloride-induced vascular injury. The Journal of biological chemistry 284, 13110-13118 (2009).
103. Semeraro, N., Biondi, A., Lorenzet, R., Locati, D., Mantovani, A. & Donati, M.B. Direct induction of tissue factor synthesis by endotoxin in human macrophages from diverse anatomical sites. Immunology 50, 529-535 (1983).
104. Bevilacqua, M.P., Pober, J.S., Majeau, G.R., Cotran, R.S. & Gimbrone, M.A., Jr. Interleukin 1 (IL-1) induces biosynthesis and cell surface expression of procoagulant activity in human vascular endothelial cells. The Journal of experimental medicine 160, 618-623 (1984).
105. Napirei, M., Karsunky, H., Zevnik, B., Stephan, H., Mannherz, H.G. & Moroy, T. Features of systemic lupus erythematosus in Dnase1-deficient mice. Nature genetics 25, 177-181 (2000).
106. Aesch, E., Büchl-Zimmermann, S., Burmester, A., Dänhardt-Pfeiffer, S., Dese, I.C., Hamers, C., Jach, G., Kässens, M., Makovitzky, J., Mulisch, M., Nixdorf-Bergweiler, B., Pütz, D., Riedelsheimer, B., von de Boom, F., Wegerhoff, R. & Welsch, U. Romeis Mikroskopische Technik. Mulisch, Maria Welsch, Ullrich, Heidelberg (2010).
107. Knuckley, B., Causey, C.P., Jones, J.E., Bhatia, M., Dreyton, C.J., Osborne, T.C., Takahara, H. & Thompson, P.R. Substrate specificity and kinetic studies of PADs 1, 3, and 4 identify potent and selective inhibitors of protein arginine deiminase 3. Biochemistry 49, 4852-4863 (2010).
108. Nakashima, K., Hagiwara, T. & Yamada, M. Nuclear localization of peptidylarginine deiminase V and histone deimination in granulocytes. The Journal of biological chemistry 277, 49562-49568 (2002).
109. Cuthbert, G.L., Daujat, S., Snowden, A.W., Erdjument-Bromage, H., Hagiwara, T., Yamada, M., Schneider, R., Gregory, P.D., Tempst, P., Bannister, A.J. & Kouzarides, T. Histone deimination antagonizes arginine methylation. Cell 118, 545-553 (2004).
110. Rohrbach, A.S., Slade, D.J., Thompson, P.R. & Mowen, K.A. Activation of PAD4 in NET formation. Frontiers in immunology 3, 360 (2012).
111. Leshner, M., Wang, S., Lewis, C., Zheng, H., Chen, X.A., Santy, L. & Wang, Y. PAD4 mediated histone hypercitrullination induces heterochromatin decondensation and chromatin unfolding to form neutrophil extracellular trap-like structures. Frontiers in immunology 3,

- 307 (2012).
112. Luo, Y., Arita, K., Bhatia, M., Knuckley, B., Lee, Y.H., Stallcup, M.R., Sato, M. & Thompson, P.R. Inhibitors and inactivators of protein arginine deiminase 4: functional and structural characterization. *Biochemistry* 45, 11727-11736 (2006).
 113. Sureda Francesc, X., Mercé, P. & Antoni, C. Flow Cytometric Determination of Cytoplasmic Oxidants and Mitochondrial Membrane Potential in Neuronal Cells. in *Methods in Enzymology*, Vol. 352 - Redox Cell Biology and Genetics Part A. (Hrsg. Sen Chandan, K. & Lester, P.). 579 Academic Press - Elsevier Science, San Diego (2002).
 114. Massberg, S., Brand, K., Gruner, S., Page, S., Muller, E., Muller, I., Bergmeier, W., Richter, T., Lorenz, M., Konrad, I., Nieswandt, B. & Gawaz, M. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *The Journal of experimental medicine* 196, 887-896 (2002).
 115. Lang, G. *Histotechnik - Praxislehrbuch für die biomedizinische Analytik*. SpringerWienNewYork, Wien (2006).
 116. Noll, S. & Schaub-Kuhnen, S. *Praxis der Immunohistochemie*. Urban & Fischer Verlag, München (2000).
 117. Nakagawa, S. & Cuthill, I.C. Effect size, confidence interval and statistical significance: a practical guide for biologists. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* 82, 591-605 (2007).
 118. Willis, V.C., Gizinski, A.M., Banda, N.K., Causey, C.P., Knuckley, B., Cordova, K.N., Luo, Y., Levitt, B., Glogowska, M., Chandra, P., Kulik, L., Robinson, W.H., Arend, W.P., Thompson, P.R. & Holers, V.M. N-alpha-benzoyl-N5-(2-chloro-1-iminoethyl)-L-ornithine amide, a protein arginine deiminase inhibitor, reduces the severity of murine collagen-induced arthritis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 186, 4396-4404 (2011).
 119. Hakkim, A., Furnrohr, B.G., Amann, K., Laube, B., Abed, U.A., Brinkmann, V., Herrmann, M., Voll, R.E. & Zychlinsky, A. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 9813-9818 (2010).
 120. : The Jackson Laboratory; 2014 [cited 2015 06.08.2015]. Available from: <http://jaxmice.jax.org/strain/000664.html>.
 121. Tuli, J.S., Smith, J.A. & Morton, D.B. Stress measurements in mice after transportation. *Laboratory animals* 29, 132-138 (1995).
 122. Kikuchi, S., Umemura, K., Kondo, K., Saniabadi, A.R. & Nakashima, M. Photochemically induced endothelial injury in the mouse as a screening model for inhibitors of vascular intimal thickening. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 18, 1069-1078 (1998).
 123. Matsuno, H., Uematsu, T., Nagashima, S. & Nakashima, M. Photochemically induced thrombosis model in rat femoral artery and evaluation of effects of heparin and tissue-type plasminogen activator with use of this model. *Journal of pharmacological methods* 25, 303-317 (1991).
 124. Westrick, R.J., Winn, M.E. & Eitzman, D.T. Murine models of vascular thrombosis (Eitzman series). *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 27, 2079-2093 (2007).
 125. Farrehi, P.M., Ozaki, C.K., Carmeliet, P. & Fay, W.P. Regulation of arterial thrombolysis by plasminogen activator inhibitor-1 in mice.

- Circulation 97, 1002-1008 (1998).
126. Göbel, T. & Kaspers, B. Immunabwehr und Blutgruppen. in Physiologie der Haustiere, Vol. 2., völlig neu bearbeitete Auflage. Wolfgang Engelhardt, Gerhard Breves, Stuttgart (2005).
127. Levin, J. & Ebbe, S. Why are recently published platelet counts in normal mice so low? Blood 83, 3829-3831 (1994).
128. Brezinschek, H.-P., Brickmann, K., Halwachs-Baumann, G., Khoschsorur, G.A., Kubasta, C., Lang, T., Meinitzer, A., Obermayer-Pietsch, B., Ramschak, H., Rezanka, E., Stolba, R. & Tiran, B. Labormedizin, Klinik - Praxis - Fallbeispiele. SpringerWienNewYork, Wien (2006 und 2011).
129. Corash, L. The relationship between megakaryocyte ploidy and platelet volume. Blood cells 15, 81-107 (1989).
130. Hagemann, O. Laborlexikon®. Laborlexikon® (15.06.2014).
131. Ware, J. Dysfunctional platelet membrane receptors: from humans to mice. Thrombosis and haemostasis 92, 478-485 (2004).
132. Subramanian, V., Knight, J.S., Parekar, S., Anguish, L., Coonrod, S.A., Kaplan, M.J. & Thompson, P.R. Design, synthesis, and biological evaluation of tetrazole analogs of Cl-amidine as protein arginine deiminase inhibitors. Journal of medicinal chemistry 58, 1337-1344 (2015).
133. Zhu, B., Gong, Y., Chen, P., Zhang, H., Zhao, T. & Li, P. Increased DNase I activity in diabetes might be associated with injury of pancreas. Molecular and cellular biochemistry 393, 23-32 (2014).
134. Jimenez-Alcazar, M., Napirei, M., Panda, R., Kohler, E.C., Kremer Hovinga, J.A., Mannherz, H.G., Peine, S., Renne, T., Lammle, B. & Fuchs, T.A. Impaired DNase1-mediated degradation of neutrophil extracellular traps is associated with acute thrombotic microangiopathies. Journal of thrombosis and haemostasis : JTH 13, 732-742 (2015).
135. Brill, A., Fuchs, T.A., Savchenko, A.S., Thomas, G.M., Martinod, K., De Meyer, S.F., Bhandari, A.A. & Wagner, D.D. Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice. Journal of thrombosis and haemostasis : JTH 10, 136-144 (2012).
136. Kannemeier, C., Shibamiya, A., Nakazawa, F., Trusheim, H., Ruppert, C., Markart, P., Song, Y., Tzima, E., Kennerknecht, E., Niepmann, M., von Bruehl, M.L., Sedding, D., Massberg, S., Gunther, A., Engelmann, B. & Preissner, K.T. Extracellular RNA constitutes a natural procoagulant cofactor in blood coagulation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104, 6388-6393 (2007).
137. Jackson, S.P. Arterial thrombosis--insidious, unpredictable and deadly. Nature medicine 17, 1423-1436 (2011).
138. Schulz, C. & Massberg, S. Platelets in atherosclerosis and thrombosis. Handbook of experimental pharmacology, 111-133 (2012).
139. Furie, B. & Furie, B.C. In vivo thrombus formation. Journal of thrombosis and haemostasis : JTH 5 Suppl 1, 12-17 (2007).
140. Crea, F. & Liuzzo, G. Pathogenesis of acute coronary syndromes. Journal of the American College of Cardiology 61, 1-11 (2013).
141. Schwartz, S.M., Galis, Z.S., Rosenfeld, M.E. & Falk, E. Plaque rupture in humans and mice. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology 27, 705-713 (2007).
142. Cheng, Q., Tucker, E.I., Pine, M.S., Sisler, I., Matafonov, A., Sun, M.F., White-Adams, T.C., Smith, S.A., Hanson, S.R., McCarty, O.J., Renne, T.,

- Gruber, A. & Gailani, D. A role for factor XIIa-mediated factor XI activation in thrombus formation in vivo. *Blood* 116, 3981-3989 (2010).
- 143.** Renne, T., Pozgajova, M., Gruner, S., Schuh, K., Pauer, H.U., Burfeind, P., Gailani, D. & Nieswandt, B. Defective thrombus formation in mice lacking coagulation factor XII. *The Journal of experimental medicine* 202, 271-281 (2005).
- 144.** Mangold, A., Alias, S., Scherz, T., Hofbauer, T., Jakowitsch, J., Panzenbock, A., Simon, D., Laimer, D., Bangert, C., Kammerlander, A., Mascherbauer, J., Winter, M.P., Distelmaier, K., Adlbrecht, C., Preissner, K.T. & Lang, I.M. Coronary neutrophil extracellular trap burden and deoxyribonuclease activity in ST-elevation acute coronary syndrome are predictors of ST-segment resolution and infarct size. *Circulation research* 116, 1182-1192 (2015).
- 145.** Reinhardt, C., von Bruhl, M.L., Manukyan, D., Grahl, L., Lorenz, M., Altmann, B., Dlugai, S., Hess, S., Konrad, I., Orschiedt, L., Mackman, N., Ruddock, L., Massberg, S. & Engelmann, B. Protein disulfide isomerase acts as an injury response signal that enhances fibrin generation via tissue factor activation. *The Journal of clinical investigation* 118, 1110-1122 (2008).

XII. DANKSAGUNG

Zuerst möchte ich HERRN PROF. DR. MED. STEFFEN MASSBERG für die Möglichkeit danken, dass ich an dieser sehr interessanten Studie mitwirken durfte und somit einen umfassenden Einblick in die kardiovaskuläre translationale Forschung bekommen konnte.

HERRN PRIV.-DOZ. DR. SVEN REESE möchte ich für die Übernahme und Durchsicht, sowie für Seine kompetente und freundliche Beratung des statistischen Teils dieser Arbeit danken.

Ein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin DR. MED. JULIA RIEGGER für Ihre sehr umsichtige und kompetente Betreuung. Mit Ihrer Geduld, Präzision und Organisation hat sie mich stets unterstützt und motiviert.

Ein weiterer Dank gilt DR. MED. VET. SUE CHANDRARATNE für Ihre Unterstützung bei der Einführung in die einzelnen Labortechniken, Ihre uneingeschränkte Erreichbarkeit und die Hilfe bei jeglichen Problemstellungen.

Des Weiteren möchte ich DR. MED. VET. MARIE-LUISE VON BRÜHL für Ihre Unterstützung bei den Operationstechniken und Ihre stets kompetente Beratung danken.

FRAU KRISTO möchte ich für Ihre unterstützende Hilfe bei der HE-Färbung der Thrombusschnitte danken.

Bedanken möchte ich mich auch bei der gesamten Arbeitsgruppe für die stets hervorragende Atmosphäre. Ich habe mich durch Euch zu jeder Zeit sehr unterstützt und motiviert gefühlt.

Ein anonymer Dank gilt auch den Patienten, die Ihr Einverständnis gegeben haben, Ihren Thrombus für die Forschung nutzen zu dürfen.

Zu danken ist an dieser Stelle auch den HERZKATHETERTEAMS DES KLINIKUMS RECHTS DER ISAR, der TECHNISCHEN UNIVERSITÄT MÜNCHEN und des DEUTSCHEN HERZZENTRUMS MÜNCHEN für die Sammlung und Konservierung der Patiententhromben.

Bedanken möchte ich mich auch bei meiner Familie, die mich immer darin bestärkt hat, meinen Weg zu gehen und im Glauben an mich selber.